

Université de Montréal

**Identification du gène *Anoctamine 5* responsable d'une
nouvelle forme récessive de dystrophie musculaire des
ceintures**

par

Véronique Bolduc

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biologie moléculaire

Octobre, 2011

© Véronique Bolduc, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

Identification du gène *Anoctamine 5* responsable d'une nouvelle forme récessive de
dystrophie musculaire des ceintures

présentée par :
Véronique Bolduc

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Côté, président-rapporteur
Bernard Brais, directeur de recherche
Daniel Sinnett, membre du jury
Rashmi Kothary, examinateur externe
Philippe Roux, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les dystrophies musculaires des ceintures (ou limb-girdle muscular dystrophy, LGMD) sont un groupe hétérogène de dystrophies musculaires chez l'adulte et sont définies par une atrophie et une faiblesse progressive qui surviennent dans les muscles proximaux. Chez une cohorte canadienne-française, nous avons précédemment décrit une nouvelle forme récessive, désignée LGMD2L et marquée par une atrophie asymétrique du quadriceps, que nous avons cartographiée au chromosome 11p12-p13 grâce à des analyses de liaison. L'objectif de ce projet de thèse était de raffiner l'intervalle candidat, puis d'identifier et de caractériser le gène muté responsable de la LGMD2L.

Grâce à une cartographie par homozygotie de polymorphismes de nucléotide simple (SNPs) réalisée sur une grande famille consanguine, nous avons redéfini l'intervalle candidat à une région du chromosome 11p14.3-p15.1. Par séquençage de l'ADN génomique et complémentaire au gène *Anoctamine 5 (ANO5)* inclus dans cet intervalle, nous avons identifié trois mutations, chez autant de familles: une substitution créant un site d'épissage aberrant, une insertion d'un nucléotide et une mutation faux-sens. Les deux premières mutations étaient associées à une hausse de la dégradation de l'ARN messager médiée par une troncation prématurée. Nous avons également identifié des mutations *ANO5* chez une seconde dystrophie musculaire de type distal cartographiant au même locus que la LGMD2L, nommée MMD3, et dont la manifestation initiale était une faiblesse des mollets, mais qui pouvait progresser vers une atrophie des quadriceps. Une réparation membranaire déficiente avait été observée chez les fibroblastes de deux patients MMD3, suggérant un rôle pour ANO5 dans ce mécanisme.

La localisation et la fonction d'ANO5 dans le muscle sont inconnues, mais cette protéine fait partie d'une famille conservée de protéines à huit domaines transmembranaires, les Anoctamines, dont certains membres sont des transporteurs

chloriques activés par le calcium. Les résultats de nos études d'immunofluorescence suggèrent qu'ANO5 se localise peu au sarcolemme, mais plutôt à une structure intracellulaire qui suit la ligne Z des myofibrilles. De façon étonnante, cette localisation était préservée chez un patient LGMD2L porteur homozygote de la mutation d'épissage, en dépit du fait que cette dernière était considérée comme une mutation nulle. Néanmoins, nous avons identifié un épissage alternatif de l'exon 15 qui se produisait sur une proportion des transcrits porteurs de la mutation d'épissage, ce qui rétablirait le cadre de lecture, soulignant la complexité de la régulation de l'épissage d'*ANO5* et laissant croire que la LGMD2L pourrait être causée par une perte de fonction partielle, et non complète, d'*ANO5*.

Des études subséquentes par des groupes européens ont montré que les anoctaminopathies 5 sont une cause fréquente de dystrophies musculaires des ceintures chez l'adulte. Notre découverte de mutations au gène *Anoctamine 5* a mis en évidence une nouvelle classe de protéines importantes pour la biologie du muscle et a ouvert la voie à de nouvelles pistes pour étudier les mécanismes par lesquels un défaut de réparation membranaire progresse en une dystrophie musculaire.

Mots-clés : Dystrophie musculaire des ceintures, LGMD, ANO5, Anoctamine, Cartographie par homozygotie

Abstract

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) encompass a broad spectrum of muscular dystrophies in which the initial weakness arises in proximal muscles. We previously described in French-Canadian (FC) families a new form of LGMD characterized by asymmetrical quadriceps femoris atrophy, named LGMD2L, which we mapped to chromosome 11p12-p13 using linkage analyses. The objectives of this thesis project were to refine the candidate interval, identify and characterize the LGMD2L gene.

Using single nucleotide polymorphisms (SNPs) homozygosity mapping in a large consanguineous family, we narrowed down the LGMD2L candidate interval to a region on chromosome 11p14.3-p15.1, and identified three mutations in the *Anoctamin 5 (ANO5)* gene located in the interval. These mutations consisted of a missense, a one-bp duplication and a splice site mutation. We demonstrated that the latter two triggered the nonsense-mediated RNA decay pathway. In addition, we identified *ANO5* mutations in cases affected by a non-dysferlin Miyoshi muscular dystrophy mapped also to chromosome 11, termed MMD3. In two MMD3 families of European descent, patients presented with calf weakness as the initial symptoms, sometimes evolving to quadriceps atrophy. Fibroblasts from one MMD3 family were shown to be defective for membrane repair.

ANO5 localization and function in muscle are unknown, but it is a member of the conserved Anoctamin family of proteins with eight transmembrane domains, of which some function as calcium-activated chloride channel. Our immunofluorescence studies on longitudinal muscle sections suggest that *ANO5* is not importantly localized to the sarcolemma, but rather to a structure following the Z-line. To our surprise, this localization was preserved for a LGMD2L patient homozygous for the splice site mutation, previously considered as a null mutation. By studying the splicing isoforms in this patient, we observed that skipping of exon 15 occurs on a proportion of transcripts, in addition to the

aberrant splicing caused by the mutation. This alternative splicing event would recover the reading frame, thus underlining the complexity of *ANO5* splicing and suggesting that LGMD2L could be the consequence of a partial, rather than complete, loss-of-function.

Subsequent studies by other groups have shown that anoctaminopathies 5 are a common cause of adult-onset LGMD. Our discovery of *ANO5* mutations has shed light on a new class of proteins important for the muscle biology and opened new research avenues to study how defective membrane repair progresses into muscular dystrophies.

Keywords : Muscular dystrophy, LGMD, ANO5, Anoctamin, Homozygosity mapping

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xvi
 CHAPITRE 1 – Introduction aux dystrophies musculaires des ceintures (LGMD)	 1
1.1 Définition et classification	2
1.1.1 Classification génétique	2
1.2 Particularités cliniques	4
1.2.1 Manifestations cliniques.....	4
1.2.2 Les dysferlinopathies (LGMD2B / MMD1) : les plus ressemblantes à LGMD2L / MMD3	6
1.2.3 Stratégie diagnostique pour les LGMD.....	8
1.2.4 Épidémiologie	9
1.3 Bases moléculaires et pathogenèse des LGMD	10
1.3.1 Stabilité du sarcolemme: les Sarcoglycanes et le complexe de protéines associées à la Dystrophine	11
1.3.2 Stabilité du sarcomère	14
1.3.3 Intégrité du sarcolemme : Dysferline et la réparation membranaire	15
1.4 LGMD2L : Une nouvelle forme de LGMD avec atrophie du quadriceps.....	18
1.4.1 Présentation clinique	19
1.4.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	19

1.4.3 Pathologie et exclusions	22
1.4.4 Génétique.....	22
1.5 Projet de thèse	22
 CHAPITRE 2 - Redéfinition du locus LGMD2L au chromosome 11p14.3-p15.1	25
2.1 Introduction.....	26
2.2 Méthodes.....	27
2.3 Résultats.....	32
Une seconde analyse de liaison et une cartographie par homozygotie redéfinissent l'intervalle candidat pour LGMD2L	32
Séquençage de gènes candidats au chromosome 11p14.3-p15.1	35
2.4 Conclusion	37
 CHAPITRE 3 - Identification de mutations récessives au gène <i>Anoctamine 5</i> responsables des dystrophies musculaires LGMD2L et MMD3 (<i>Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies</i>)	38
3.1 Contribution des co-auteurs	39
3.2 Report in The American Journal of Human Genetics	41
Abstract	42
Results and Discussion.....	43
Acknowledgments	58
Web Resources	59
3.3 LGMD2L, une forme commune parmi les dystrophies musculaires des ceintures.....	62
3.4 Recherche de mutations <i>ANO5</i> dans une cohorte canadienne-française de LGMD récessive	64

CHAPITRE 4 - Un épissage alternatif préserverait la localisation d'ANO5 chez un patient LGMD2L.....	68
4.1 Contribution des co-auteurs	69
4.2 Manuscrit en préparation	70
Introduction	71
Méthodes	74
Résultats	80
Localisation d'ANO5 à un compartiment cellulaire interne qui suit la ligne Z du muscle	80
Préservation de la localisation d'ANO5 pour un patient LGMD2L : rétablissement du cadre de lecture sur une proportion de transcrits grâce à l'épissage alternatif de l'exon 15	83
Discussion	95
Remerciements	100
 CHAPITRE 5 – Conclusions et directions futures.....	105
5.1 Caractérisation des anoctaminopathies 5 (LGMD2L et MMD3).....	106
Caractérisation de la LGMD2L et des LGMD au Québec	112
5.2 Localisation et fonction d'ANO5.....	113
Directions futures	116
5.3 ANO5 : un nouvel acteur des dystrophies musculaires.....	117
 Bibliographie	124
 Annexe I. Curriculum vitae.....	xix
Annexe II. Jarry, Rioux, Bolduc et al., <i>Brain</i> (2007) 130 : 368-80	xxii
Annexe III. Srouf, Bolduc et al., <i>Neuromusc Dis</i> (2010) 20 : 453-7	xxxvi
Annexe IV. Tableau des amorces utilisées	xlii

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 – Introduction aux dystrophies musculaires des ceintures

Tableau 1.1 Classification génétique des LGMD	5
--	---

CHAPITRE 2 - Redéfinition du locus LGMD2L au chromosome 11p14.3-p15.1

Tableau 2.1 Régions d'homozygotie de plus de 100 SNPs consécutifs partagées uniquement par trois atteints de la famille consanguine FC9.	35
--	----

CHAPITRE 3 - Identification de mutations récessives au gène *Anoctamine 5* responsables des dystrophies musculaires LGMD2L et MMD3

Tableau 3.1 Clinical data of patients carrying <i>ANO5</i> mutations.....	54
Tableau 3.S1 MRI and MRC muscular weakness observed in <i>ANO5</i> patients (1/2).....	60
Tableau 3.S1 MRI and MRC muscular weakness observed in <i>ANO5</i> patients (2/2).....	61
Tableau 3.2 Dépistage de mutations et données cliniques sommaires sur une cohorte canadienne-française de LGMD récessive.....	65

CHAPITRE 5 – Conclusions et directions futures

Tableau 5.1 Le phénotype LGMD2L.....	108
---	-----

Liste des figures

CHAPITRE 1 – Introduction aux dystrophies musculaires des ceintures

Figure 1.1	Distribution de la faiblesse selon le type de dystrophie musculaire	3
Figure 1.2	Protéines impliquées dans les LGMD	12
Figure 1.3	Modèle de réparation membranaire via la Dysferline	17
Figure 1.4	Caractérisation du phénotype LGMD2L chez la famille FC9	21

CHAPITRE 2 - Redéfinition du locus LGMD2L au chromosome 11p14.3-p15.1

Figure 2.1	Redéfinition de l'intervalle candidat LGMD2L pour deux familles canadiennes-françaises	34
-------------------	--	----

CHAPITRE 3 - Identification de mutations récessives au gène *Anoctamine 5* responsables des dystrophies musculaires LGMD2L et MMD3

Figure 3.1	Identification of <i>ANO5</i> mutations in French-Canadian LGMD2L families	46
Figure 3.2	Identification of <i>ANO5</i> mutations in non-dysferlin Miyoshi Myopathy families	49
Figure 3.3	Analysis of <i>ANO5</i> expression following cycloheximide treatment in patients carrying mutations producing premature terminations	52
Figure 3.4	Représentation schématique de la protéine ANO5 et des mutations associées à un phénotype de dystrophie musculaire	63

CHAPITRE 4 - Un épissage alternatif préserverait la localisation d'ANO5 chez un patient LGMD2L

Figure 4.1	Localisation d'ANO5 humain à des compartiments cellulaires internes.....	82
Figure 4.2	ANO5 se localise à une structure qui suit la ligne Z du muscle murin	85
Figure 4.3	Localisation prédite pour ANO5	86

Figure 4.4	Caractérisation histologique du patient LGMD2L FC9-II :9	88
Figure 4.5	Le saut de l'exon 15 rétablit le cadre de lecture chez des transcrits porteurs de la mutation d'épissage c.1295C>G	91
Figure 4.6	Isolation d'un transcrit <i>ANO5</i> complet avec cadre de lecture chez un patient porteur de la mutation c.1295C>G.....	93
Figure 4.S1	Caractérisation des anticorps ANO5 sur des cellules surexprimant ANO5	102
Figure 4.S2	Caractérisation des anticorps ANO5 sur tissus musculaires (humains et souris)	104

CHAPITRE 5 – Conclusions et directions futures

Figure 5.1	Accumulation de vésicules subsarcolemmales chez des patients déficients pour la Dysferline.....	119
Figure 5.2	Modèle proposé pour le rôle d'ANO5 dans la réparation membranaire	120

Liste des abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ANO	Anoctamine
bp	Base pairs
CaCC	Calcium-activated chloride channel / conductance
CAPN3	Calpaïne 3
CAV3	Cavéoline 3
cDNA	Complementary DNA (ADNc)
CEPH	Centre d'étude du polymorphisme humain
CK	Créatine kinase
Ctrl	Control (témoin)
DUF590	Domain of unknown function 590
DMOP	Dystrophie musculaire oculopharyngée
Dysf	Dysferline
FC	French Canadian (Canadien-français)
GDD1	Gnatho-diaphyseal dysplasia 1
hGDD1	Human Gnatho-diaphyseal dysplasia 1 gene (=ANO5)
Homo	Homozygote ou homozygotie
Hetero	Hétérozygote ou hétérozygotie
kb	Kilo paires de bases
kDa	Kilo dalton
LGMD	Limb-girdle muscular dystrophy (dystrophie musculaire des ceintures)
LOD	Logarithm of the odd score
MAMs	Membranes associées aux mitochondries
MMD	Miyoshi myopathy ou Miyoshi muscular dystrophy
MW	Molecular weight
NMD	Nonsense-mediated RNA decay

nt	Nucléotides
pb	Paires de bases
RS	Réticulum sarcoplasmique
RT-PCR	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
Sgc	Sarcoglycane
SNP	Single nucleotide polymorphism
Spl	Splice (épissage)
SR	Sarcoplasmic reticulum
TM	Domaines transmembranaires
TMEM16	Transmembrane protein 16
T.P.	Température pièce
UK	United Kingdom
UTR	Untranslated region

À Jean-Guy Bolduc

Remerciements

Mes remerciements vont d'abord à Bernard Brais, qui a supervisé mes études doctorales durant six années. Bernard, je te suis infiniment reconnaissante pour ce beau projet de recherche que tu m'as confié et pour toutes les opportunités extraordinaires que celui-ci m'a apportées. Je te remercie aussi de m'avoir accompagnée et guidée dans ce cheminement de carrière et de vie. Je garde un excellent souvenir de ces années passées dans ton laboratoire.

Je tiens aussi à remercier Lambert Busque, qui m'a donné au moment opportun les encouragements dont j'avais besoin pour me lancer dans les études supérieures.

Mes remerciements à Jonathan Jarry, qui m'a légué ce projet à la fin sa maîtrise, puis à Talita, à qui je passe à mon tour le flambeau. Talita, je suis très enchantée que tu poursuives le travail que nous avons accompli ensemble depuis deux ans et je te souhaite de belles découvertes et beaucoup de plaisir avec notre protéine favorite !

Je remercie chaleureusement tous les membres actuels et passés du labo Brais avec qui j'ai partagé de très beaux moments au cours de ce doctorat et avec qui j'ai développé de belles amitiés, en particulier Marie-Josée, notre « maman » qui m'a toujours généreusement épaulée, Catherine, pour les bonnes discussions que nous avons échangées à côté de la cafetière et les bonnes soirées que nous avons passées, Roxanne, qui m'a tout appris sur les immunos et qui, par la qualité de son travail et sa rigueur m'a inspirée, Martine et Talita, avec qui j'ai bien aimé partagé les journal-club de muscle... mais surtout les coupes de vin en congrès ou en 5 à 7 !, Rébecca et Samira, avec qui j'ai bien rigolé dans des conversations qui n'avaient pas toujours rapport au labo ;), Maria Sol, qui m'a donné un coup de main, Myriam, ma grande amie, et Arnaud, qui me manque. J'en profite aussi pour

souligner le plaisir que j'ai eu à côtoyer les membres de l'Axe Neurosciences, en particulier la gang du labo Cossette.

Merci à tous les gens qui, à une étape ou l'autre, ont collaboré à ce projet en fournissant leur temps et leur expertise: Louise Charron, Kym M. Boycott et Jean-Pierre Bouchard, qui ont référé des familles, Lina Loisel, qui accomplit un travail immense au recrutement des familles, Marie-Pierre Dubé et Sylvie Provost, pour les analyses SNPs en début de projet, Erin O'Ferrall, pour les biopsies effectuées et pour son opinion précieuse sur les études histologiques, Michael Sinnreich et Tanja Taivassalo, pour avoir organisé et effectué des biopsies de patients, Robert Guérin, que je ne pourrai jamais remercier suffisamment, pour sa grande générosité à nous préparer et fournir des échantillons, Yves Robitaille, pour son savoir en microscopie électronique, Martine Girard, qui m'a généreusement aidée avec la purification d'épitopes, Lucie Parent et son équipe (Yolaine Dodier, Fabrice Marger), pour les études électrophysiologiques sur ANO5, mais aussi pour tout le bagage de connaissances que j'ai pu apprécier de cette collaboration, Normand Leblanc, qui a pris la relève des études électrophysiologiques, Guy Rouleau et l'équipe responsable de l'immortalisation des cellules, qui accomplissent un travail d'une grande valeur, Janet Laganière, pour m'avoir enseigné les rudiments de la microscopie et du cryostat. Merci à Hiroshi Inoue, pour les nombreux échanges et pour nous avoir généreusement fourni du matériel. Je remercie aussi les membres de mon comité de suivi, Frédéric Charron et Imed Gallouzi, de même que mes superviseurs de maîtrise, Lambert Busque et Pierre Chagnon, pour leur support tout au long de mon doctorat.

Un merci particulier aux patients qui ont accepté de participer à notre étude et à leur famille, pour leur générosité et leur persévérance.

Enfin, un immense merci à mes amis, que je connais du secondaire, de Sherbrooke, d'Hémax, d'HMR, de Notre-Dame, par Chantal ou par Caroline... Je me sens privilégiée

d'être si bien entourée. Un grand merci à ma famille, mes parents, Daniel et Louise, la gang de cousins et de cousines, et surtout à ma soeur Annie que j'adore et à mes deux futur(e)s filleul(e)s que j'ai si hâte de connaître – merci à vous tous de faire partie de ma vie !

CHAPITRE 1 – Introduction aux dystrophies musculaires des ceintures (LGMD)

1.1 Définition et classification

*[DYSTROPHIE –du gr dus- difficulté, manque
et trophê - nourriture
med - Dégénérescence d'une structure anatomique]*

Les dystrophies musculaires forment un groupe hautement hétérogène de myopathies héréditaires caractérisées par une dégénérescence progressive du muscle. Elles sont reconnaissables pathologiquement par des signes de nécrose et de régénération et cliniquement, par de la faiblesse distribuée à certains groupes de muscles. Selon la distribution des muscles affectés, on peut sous-diviser les dystrophies musculaires en six grandes catégories (**Figure 1.1**). Le terme « dystrophie musculaire des ceintures » (pour limb-girdle muscular dystrophy, LGMD) désigne ainsi les dystrophies musculaires dont l'atteinte prédomine dans les muscles proximaux, c'est-à-dire les muscles ancrés aux ceintures scapulaire et pelvienne [1] (**Figure 1.1C**).

À la fin des années 1990, suite aux progrès en génétique moléculaire, il apparût clair que les LGMD représentaient en elles-mêmes un groupe hétérogène de maladies. En 1995, des critères précis étaient établis pour définir les LGMD: une faiblesse proximale prédominante, qui épargne les muscles distaux tôt dans le cours de la maladie et qui épargne les muscles faciaux et extra-oculaires, un développement qui peut débuter à tout âge mais qui n'est typiquement pas congénital, une transmission qui peut être autosomique récessive ou dominante [2].

1.1.1 Classification génétique

L'identification des premiers loci chromosomiques associés aux LGMD a motivé un consortium formé de cliniciens et de scientifiques représentant plusieurs pays à adopter une classification basée sur le mode de transmission, puis sur la génétique [4]. Ainsi, LGMD1

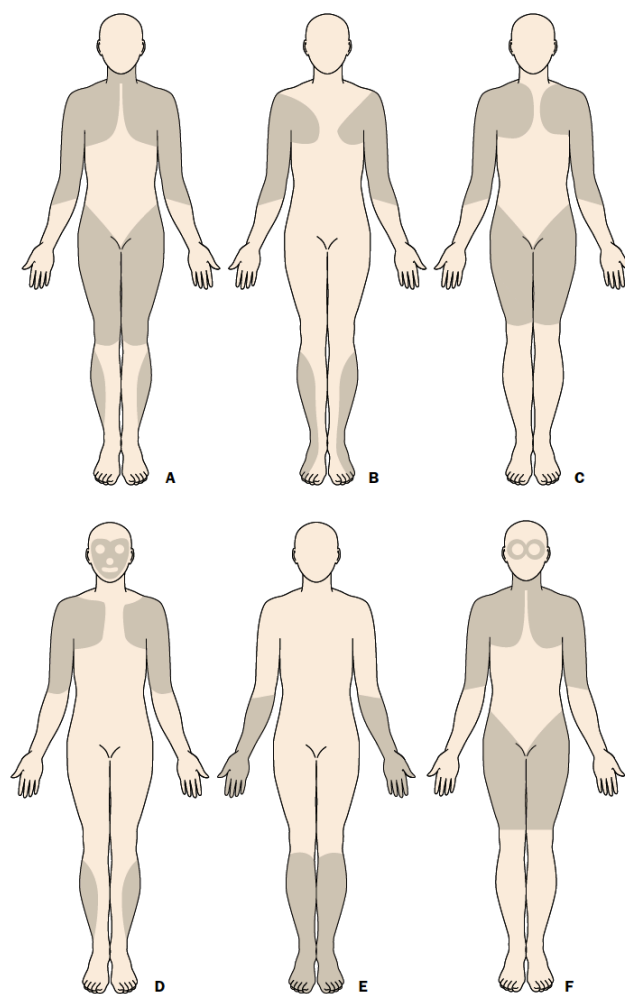


Figure 1.1 Distribution de la faiblesse selon le type de dystrophie musculaire

Les zones ombragées représentent les groupes de muscles affectés.

(A) Duchenne et Becker.

(B) Emery-Dreifuss.

(C) LGMD (dystrophie musculaire des ceintures).

(D) Facioscapulohumérale.

(E) Distale.

(F) DMOP (dystrophie musculaire oculopharyngée).

Tiré de Emery, Lancet 2002 [3].

désigne les LGMD dominantes, LGMD2, les récessives, suivi d'une lettre pour marquer le sous-type, attribué selon l'ordre de découverte des loci (LGMD1A-H, LGMD2A-Q, **Tableau 1.1**). À ce jour, huit formes dominantes et 17 formes récessives ont été décrites, et les gènes mutés ont été identifiés pour 20 de ces formes (**Tableau 1.1**).

1.2 Particularités cliniques

1.2.1 Manifestations cliniques

Par définition, les dystrophies musculaires des ceintures sont caractérisées par une atteinte progressive qui débute par une faiblesse et une fonte des muscles proximaux. Néanmoins, les manifestations cliniques peuvent varier considérablement d'une forme de LGMD à l'autre, quant à l'âge du début des symptômes, les niveaux sériques de créatine kinase (CK), la sévérité, la présence de cardiomyopathie, d'hypertrophie musculaire, de contractures et l'atteinte des muscles distaux, etc. Certains patients LGMD développent des symptômes sévères dès l'enfance et sont à risque d'insuffisance cardiaque, dans le cas par exemple des sarcoglycanopathies (LGMD2C-F) [5], tandis que d'autres présentent des symptômes plus légers, accompagnés d'une augmentation modeste des niveaux de CK, et ne perdront jamais la locomotion, par exemple certains patients atteints de la LGMD2H (TRIM32) [6]. L'espérance de vie en général n'est pas affectée, sauf chez les patients qui présentent des complications cardiaques et/ou respiratoires. Toutefois, les manifestations cliniques de chacune des LGMD ne sont pas uniformes, vu la variabilité clinique inter-, mais aussi intrafamiliale, observée chez presque toutes les formes de LGMD2 [7-10].

Plusieurs des gènes impliqués dans les LGMD sont également associés à un spectre phénotypique plus large, phénomène désigné par le terme hétérogénéité phénotypique. *CAV3*, par exemple, est muté dans la LGMD1C [11, 12], dans la « rippling muscle

Tableau 1.1 Classification génétique des LGMD

LGMD	Loci/Gènes	Protéines	Références
Dominantes			
LGMD1A	<i>TTID</i>	Myotiline	Hauser <i>et al.</i> , 2000
LGMD1B	<i>LMNA</i>	Lamine A/C	Muchir <i>et al.</i> , 2000
LGMD1C	<i>CAV3</i>	Cavéoline 3	Minetti <i>et al.</i> , 1998
LGMD1D	6q22	n/d	Messina <i>et al.</i> , 1997
LGMD1E	7q36	n/d	Speer <i>et al.</i> , 1999
LGMD1F	7q31.1	n/d	Palenzuela <i>et al.</i> , 2003
LGMD1G	4p21	n/d	Starling <i>et al.</i> , 2004
LGMD1H	3p23-p25	n/d	Bisceglia <i>et al.</i> , 2010
Récessives			
LGMD2A	<i>CAPN3</i>	Calpaïne 3	Richard <i>et al.</i> , 1995
			Bashir <i>et al.</i> , 1998;
LGMD2B	<i>DYSF</i>	Dysferline	Liu <i>et al.</i> , 1998
LGMD2C	<i>SGCG</i>	γ -Sarcoglycane	Noguchi <i>et al.</i> , 1995
LGMD2D	<i>SGCA</i>	α -Sarcoglycane	Roberds <i>et al.</i> , 1994
LGMD2E	<i>SGCB</i>	β -Sarcoglycane	Lim <i>et al.</i> , 1995
LGMD2F	<i>SGCD</i>	δ -Sarcoglycane	Bonnemann <i>et al.</i> , 1995
LGMD2G	<i>TCAP</i>	Téléthonine	Moreira <i>et al.</i> , 2000
LGMD2H	<i>TRIM32</i>	TRIM32	Frosk <i>et al.</i> , 2002
LGMD2I	<i>FKRP</i>	Fukutine-related protein	Brockington <i>et al.</i> , 2001
LGMD2J	<i>TTN</i>	Titine	Hackman <i>et al.</i> , 2002
LGMD2K	<i>POMT1</i>	Protein-O-mannosyltransferase 1	Balci <i>et al.</i> , 2005
LGMD2L	<i>ANO5</i>	Anoctamine 5	Bolduc <i>et al.</i> , 2010
LGMD2M	<i>FKTN</i>	Fukutine	Godfrey <i>et al.</i> , 2006
LGMD2N	<i>POMT2</i>	Protein-O-mannosyltransferase 2	Godfrey <i>et al.</i> , 2007
		Protein-O-linked mannose beta1,	
LGMD2O	<i>POMGnT1</i>	2-N-acetylglucosaminyltransferase	Clement <i>et al.</i> , 2008
LGMD2P?	<i>PLEC</i>	Plectine	Gundesli <i>et al.</i> , 2010
LGMD2Q?	<i>DAG1</i>	Dystroglycane	Hara <i>et al.</i> , 2011

disease » [13] et est responsable d'un syndrome d'hyper-CKémie familiale [14-16]. Un autre exemple est celui du gène de la *Dysferline* qui est à la fois muté dans la LGMD2B, la myopathie distale de Miyoshi (MM ou MMD1) [17, 18] et la myopathie du compartiment antéro-distal des jambes [19]. L'exemple le plus remarquable est celui des mutations de la *Lamine A/C* qui sont associées à la LGMD1B, à la dystrophie musculaire Emery-Dreifuss avec atteinte cardiaque [20], et à la progéria de Hutchinson-Gilford [21], pour ne nommer que celles-ci.

Les raisons pour ces hétérogénéités phénotypiques et ces variabilités inter- et intrafamiliales sont mal comprises, considérant la faible corrélation entre le génotype et le phénotype pour plusieurs des gènes LGMD [22-24] et considérant qu'une même mutation est capable d'induire deux phénotypes distincts, parfois dans la même famille, comme il l'a été rapporté pour la *Dysferline* [25, 26].

1.2.2 Les dysferlinopathies (LGMD2B / MMD1) : les plus ressemblantes à LGMD2L / MMD3

Tel qu'il sera décrit à la **section 1.4**, nous avons identifié une nouvelle forme récessive de LGMD, nommée LGMD2L. La LGMD2B et son variant allélique, la myopathie de Miyoshi (MM ou MMD1), sont les dystrophies musculaires les plus ressemblantes à la LGMD2L / MMD3.

La LGMD2B et la MMD1 étaient identifiées comme deux entités distinctes qui cartographiaient au même locus sur le chromosome 2 [27-29], avant que le clonage du gène *Dysferline* ne démontre qu'elles étaient en fait deux formes alléliques [17, 30]. Tel que mentionné plus haut, des mutations au gène *Dysferline* ont aussi été associées à un autre phénotype (dystrophie du compartiment antéro-proximal), mais qui se présente de façon moins fréquente. Pour la LGMD2B et la MMD1, les symptômes débutent généralement

vers la fin de l'adolescence ou le début de l'âge adulte et les niveaux sériques de CK sont considérablement élevés [31, 32]. La progression est en général lente, quant à la faiblesse et la perte de la locomotion (certains patients ne seront jamais confinés au fauteuil roulant). Il est fréquent d'observer chez ces patients des antécédents de douleurs aux mollets avant le développement des premiers symptômes, de même qu'une performance physique similaire ou même supérieure à la moyenne avant le début des symptômes [23].

Ainsi, ce qui distingue la LGMD2B et la MMD1 est la nature des atteintes musculaires initiales. Les patients LGMD2B présentent une faiblesse proximale, plus importante aux membres inférieurs que supérieurs, tandis que les patients MMD1 éprouvent une faiblesse des mollets qui les rend inaptes à se tenir sur le bout des orteils [18, 23, 33]. C'est à la progression de la maladie que cette distinction s'estompe : les patients MMD1 développent une faiblesse proximale et inversement, les patients LGMD2B montrent une atteinte importante des gastrocnemii, les empêchant à leur tour de se tenir sur le bout des orteils [18, 23]. Il est maintenant d'opinion que bien que l'atteinte débute dans des compartiments différents pour ces deux phénotypes, la maladie progresse vers un phénotype plus uniforme où les particularités de chacune, avec les décennies, se chevauchent jusqu'à se fondre [34, 35].

À l'analyse histologique, des trouvailles similaires ont été observées chez les patients LGMD2B et MMD1, en particulier la présence d'infiltrats inflammatoires, qui est plus remarquable que pour d'autres LGMD [36-39]. En général, les patients répondent aux traitements par corticostéroïdes [31]. Parmi les autres trouvailles, notons de multiples lésions focales qui se manifestaient par une discontinuité du sarcolemme, par l'élargissement de la membrane basale, de même que par l'accumulation de vésicules subsarcolemmales [40-43].

1.2.3 Stratégie diagnostique pour les LGMD

Considérant la grande variabilité des manifestations cliniques, il peut s'avérer difficile de diagnostiquer le bon sous-type de LGMD, particulièrement dans les cas où les symptômes et les signes cliniques sont peu sévères [32]. Certains indices de l'évaluation clinique peuvent tout de même orienter vers un diagnostic. Par exemple, la présence d'hypertrophie des mollets peut faire penser aux sarcoglycanopathies (LGMD2C-F) ou à la LGMD2I (FKRP), tandis qu'une faiblesse des mollets rappelle les dysferlinopathies (LGMD2B) [31, 44]. L'évaluation doit ensuite passer une série d'analyses de laboratoire (calcul des taux de CK, analyses histologiques et immunohistologiques de la biopsie musculaire); cependant, ces outils servent avant tout de guide pour diriger l'analyse moléculaire génétique (la recherche des mutations) qui demeure l'étalon (« gold standard ») pour déterminer le sous-type et établir le diagnostic définitif [31, 45].

Bien que les caractéristiques histopathologiques (nécrose, fibres lobées, fibrose, infiltration graisseuse) soient peu prédictives d'un sous-type, l'analyse de la biopsie est d'intérêt pour tester l'expression protéique. Une déficience pour une protéine signifie souvent un défaut primaire, quoiqu'elle puisse parfois aussi être le résultat d'une réduction secondaire. Par exemple, une déficience d'une Sarcoglycane peut entraîner la réduction secondaire d'une ou de plusieurs des trois autres Sarcoglycanes, rappelant qu'elles forment un complexe à la membrane plasmique [46]. La Calpaïne 3 a aussi été montrée pour être réduite lorsqu'il y avait absence de Dysferline ou de Titine [47, 48]. Pour cette raison, il est courant de tester une batterie d'anticorps sur l'échantillon avant d'interpréter les résultats [45]. À l'inverse, un défaut primaire ne se manifeste pas nécessairement par une absence de la protéine en question; selon le type de mutations, l'expression de la protéine peut être simplement réduite ou mal localisée [45]. Par exemple, pour certains patients dysferlinopathiques, il est observé par immunohistochimie une localisation anormale de la Dysferline dans le

cytoplasme plutôt qu'à la membrane [49]. L'immunoblot quant à lui est utile pour vérifier le poids moléculaire et l'abondance.

Un diagnostic définitif est atteint lorsque les mutations causales sont identifiées. La vaste majorité des mutations connues sont détectables par les techniques standard comme le séquençage des exons ou de l'ADNc. Néanmoins, compte tenu de l'ampleur de la tâche que peut représenter le séquençage de tous les gènes LGMD (20 gènes connus), de même que de la grande taille de certains d'entre eux (*Dysferline* : 55 exons, *Titine* : 363 exons), l'approche moléculaire est ciblée en fonction des trouvailles de l'évaluation clinique et du laboratoire.

1.2.4 Épidémiologie

Il existe peu de données sur la prévalence des LGMD, et celle-ci dépendra de la population étudiée. En Grande-Bretagne du Nord, il est estimé que la prévalence des LGMD, tous sous-types confondus, est de 2.27/100 000 [50], ce qui représente environ 6% de toutes les maladies neuromusculaires [50].

La fréquence relative de chaque sous-type varie aussi d'une population à l'autre, en fonction de l'origine ethnique et des effets fondateurs. Néanmoins, les LGMD dominantes sont moins fréquentes que les récessives, et LGMD1C (CAV3) représente la plus abondante des LGMD1 [49-53], suivie par LGMD1B (Lamine A/C) [54]. LGMD2A (CAPN3) est la plus commune des LGMD mondialement, particulièrement en Europe et en Australie [49-54]. Au Danemark, LGMD2I (FKRP) représente la plus grande proportion des LGMD2 [55], alors qu'au Royaume-Uni et aux États-Unis, elle se classe deuxième [50, 54]. LGMD2B (Dysferline) est la plus fréquente des LGMD aux États-Unis [54], et elle est deuxième en Europe et en Australie [49, 52, 53]. Les sarcoglycanopathies (LGMD-C-F) prises ensembles forment un groupe non-négligeable de LGMD2 aux États-Unis, au

Danemark, aux Pays-Bas et en Italie [51-55]. Les LGMD2G, H, J, K, M-O sont rares et sont restreintes, d'après nos connaissances actuelles, à certaines régions géographiques, par exemple au Brésil pour LGMD2G (Téléthonine) et en Finlande pour LGMD2J (Titine) [31].

Malgré les progrès réalisés au cours des 15 dernières années pour identifier les gènes mutés responsables des LGMD, une proportion significative de patients LGMD, variant entre 25% et 78% selon les populations étudiées [31, 49-53], est toujours sans diagnostic moléculaire, indiquant que d'autres gènes mutés sont encore à découvrir.

1.3 Bases moléculaires et pathogenèse des LGMD

Les fibres musculaires doivent composer avec les grands stress qu'elles subissent au fil des contractions et des étirements. Des domaines et des complexes protéiques spécialisés de la cellule sont en place pour amenuiser l'impact de ces stress. De plus, des mécanismes ont été développés pour répondre aux lésions de toutes sortes lorsqu'elles surviennent, soit en réparant les ruptures membranaires, ou encore en régénérant les fibres nécrosées. La dystrophie musculaire est initiée lorsque l'accumulation de lésions (conséquences d'une fragilité membranaire ou d'une déficience à les réparer) entraîne une hausse de la nécrose dans le tissu, et progresse lorsque cette nécrose dépasse la capacité des fibres à procéder à la régénération. Éventuellement, des infiltrats adipeux ou fibreux remplacent les fibres nécrosées, et réduisent la capacité du muscle à générer de la force.

Les 20 gènes connus associés aux différentes formes de LGMD encodent des protéines que l'on peut regrouper selon cinq catégories: (1) les protéines du complexe de protéines associées à la Dystrophine (Dystrophin-associated glycoprotein complex, DGC) et les protéines du sarcolemme : Sarcoglycanes, Dystroglycane, Dysferline, Cavéoline 3; (2) les

glycosyltransférases qui modifient la Dystroglycane du DGC : Fukutine, FKR, POMT1, POMGnT, POMT2; (3) les protéines du sarcomère (l'appareil contractile du muscle) : Titine, Myotiline, Téléthone; (4) les enzymes cytoplasmiques : Calpaïne 3 (protéase), TRIM32 (ubiquitin-ligase); et enfin, (5) les protéines de la membrane nucléaire : Lamine A/C (**Figure 1.3**). Il n'existe pas de modèle unifiant ou de voie cellulaire unique pour expliquer le développement et la progression des LGMD, puisque ces protéines sont impliquées dans une variété de fonctions du muscle. Notre compréhension à ce jour est que la majorité de ces protéines est impliquée dans l'intégrité de la structure du DGC et la stabilité du sarcolemme (membrane plasmique de la fibre musculaire). Toutefois, d'autres sont aussi importantes pour la stabilité du sarcomère (unité contractile du muscle), tandis que d'autres sont impliquées dans la réparation membranaire.

1.3.1 Stabilité du sarcolemme: les Sarcoglycane et le complexe de protéines associées à la Dystrophine

Le DGC est un complexe de protéines présent au sarcolemme des muscles squelettiques dont l'importance est reflétée par la manifestation de dystrophies musculaires lorsque l'une ou l'autre des composantes est mutée [56]. Le DGC comprend la Dystrophine, une longue protéine cytoplasmique rattachée à l'actine filamenteuse [57], la β -Dystroglycane, une protéine à un domaine transmembranaire liée d'une part à la Dystrophine [58], ainsi que l' α -Dystroglycane, reliée de façon non-covalente à la β -Dystroglycane à la surface de la cellule et qui, à son tour, lie les protéines de la matrice extracellulaire, telles la Laminine-2 [59]. Le DGC comprend également un autre sous-complexe de glycoprotéines, les Sarcoglycane (α -, β -, γ -, et δ -Sarcoglycane), qui, avec le Sarcospan [60], sont reliées aux Dystroglycane [61]. Enfin, le DGC inclut des protéines cytoplasmiques, les Dystrobrevines [62, 63] et les Syntrophines [64], rattachées à la Dystrophine (**Figure 1.3**). Le DGC forme ainsi un axe cytosquelette-sarcolemme-matrice extracellulaire dont les rôles seraient multiples, tels qu'assurer une connexion avec la matrice extracellulaire [66],

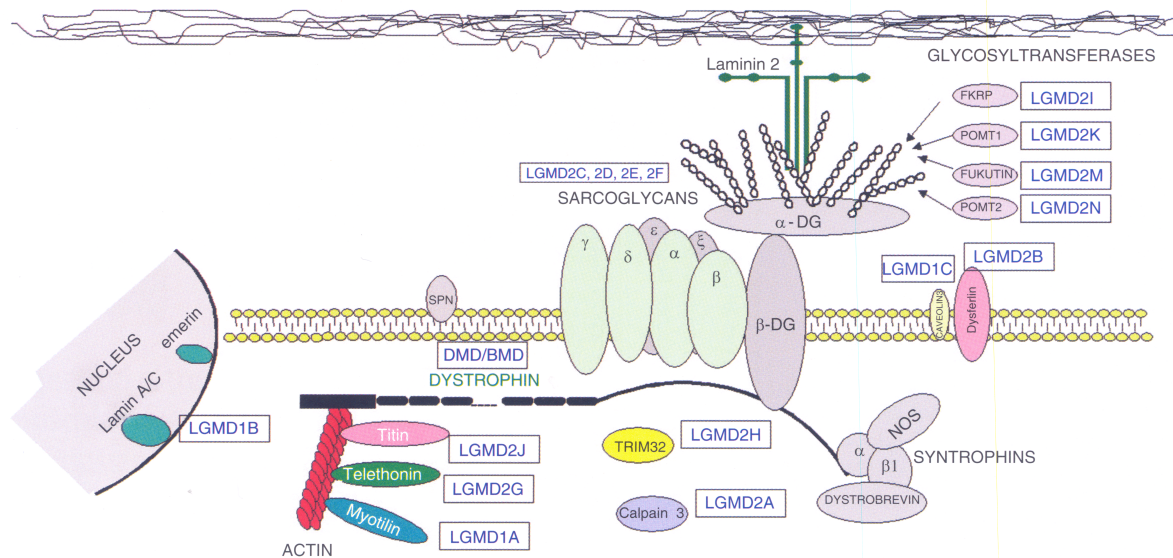


Figure 1.2 Protéines impliquées dans les LGMD

Schéma représentant la localisation et les interactions entre les protéines impliquées dans les LGMD dominantes (LGMD1) et récessives (LGMD2).

Tiré de Vainzof et Bushby, In Disorders of Voluntary Muscle, 8th edition, 2010 [65].

qu'offrir un lien structurel pour stabiliser la membrane et prévenir sa rupture lors des cycles de contraction-relaxation [67, 68], et que transmettre les forces contractiles et réguler la signalisation mécanique [69-71].

Dans le muscle squelettique, l' α -Dystroglycane joue un rôle clé dans la connexion du DGC à la matrice extracellulaire et dans le développement et le maintien de la membrane basale, de par ses nombreux domaines riches en sérine et thréonine, hautement O-glycosylés, et essentiels pour sa liaison avec les protéines de la matrice [57, 72]. Les glycosyltransférases POMT1, POMT2, POMGnT et potentiellement Fukutin et FKR P participent à la maturation post-traductionnelle de l' α -Dystroglycane durant son transport vers le sarcolemme (revu par [73]). Des mutations à ces gènes entraînent des anomalies de la glycosylation et sont responsables de nombreuses pathologies humaines, entre autres les LGMD2I, 2K, 2M, 2N et 2O [24, 74-77]. Chez les patients porteurs de mutations au gène *FKRP*, par exemple, un déplacement de la bande correspondant à la l' α -Dystroglycane en immunoblot est accompagné d'une diminution d'immunoréactivité pour l'anticorps reconnaissant la forme glycosylée de l' α -Dystroglycane [72, 78, 79]. La sévérité du phénotype est par ailleurs corrélée au degré de réduction de l'immunoréactivité [80]. Il est ainsi pensé que l'hypoglycosylation qui résulte de ces gènes mutés perturbe la liaison de la Dystroglycane, et par conséquent du DGC, avec la matrice extracellulaire et le maintien de la membrane basale [72, 81], ce qui serait à la base du développement de la dystrophie musculaire chez ces patients. Récemment, un défaut primaire à la Dystroglycane a été pour la première fois identifié, chez un patient atteint d'une dystrophie musculaire des ceintures, accompagnée de retard mental [82]. La mutation chez ce patient était un changement d'un résidu thréonine pour une méthionine qui résultait en une réduction de la glycosylation de l' α -Dystroglycane et en conséquence, une diminution de la capacité de cette dernière à lier des composantes de la matrice extracellulaire [82].

Les fonctions du sous-complexe de Sarcoglycanes sont encore mal comprises, mais pourraient être à la fois structurelles et signalisatrices [83]. Les Sarcoglycanes sont des protéines qui possèdent chacune un domaine transmembranaire, qui sont assemblées en complexe au sarcolemme [84], et qui, par leurs domaines extracellulaires peuvent indirectement lier l' α -Dystroglycane [60] et par leurs domaines intracellulaires, peuvent lier la Filamine-2 du cytosquelette [85]. Par ailleurs, les Sarcoglycanes possèdent de nombreux sites de phosphorylation dans leur portion intracellulaire qui peuvent être modifiés en réponse à l'adhésion cellulaire [86], et participer à la signalisation mécano-dépendante [71]. Les mutations aux gènes γ -, α -, β -, et δ -Sarcoglycane sont responsables des LGMD2C à 2F, respectivement [87-90]. Il a été suggéré qu'une déficience en Sarcoglycanes n'entraînait pas une fragilité membranaire, au même titre que la déficience en Dystrophine [91]; néanmoins, la perte de l'un ou l'autre des Sarcoglycanes est associée à une diminution d'expression des autres Sarcoglycanes, qui est variable d'un patient à l'autre [46, 90], et qui résulte en une déstabilisation du complexe DGC [92].

1.3.2 Stabilité du sarcomère

Quelques protéines localisées au sarcomère, telles la Titine, la Téléthonine et la Myotiline, auraient un rôle structurel pour l'organisation, l'ancrage et la stabilisation de celui-ci (revu par [93]). La Titine, en particulier, est une protéine géante, qui suit les filaments d'actine et de myosine et qui, en interagissant avec bon nombre de protéines du sarcomère, favorise le maintien des filaments lors des cycles de contraction-relaxation [94]. Des mutations à ces gènes sont responsables de formes rares de LGMD, soit les LGMD2J, 2G et 1A, respectivement [95-97].

1.3.3 Intégrité du sarcolemme : Dysferline et la réparation membranaire

La membrane plasmique constitue pour la cellule une barrière physique destinée à protéger l'intégrité de son cytoplasme. Les cellules, et particulièrement celles sujettes à de grandes tensions comme les cellules musculaires, doivent être aptes à réagir rapidement à la suite de ruptures membranaires afin de les colmater, un processus qui nécessite l'apport et la fusion d'endomembranes par exocytose [98-101]. Dans les myotubes, il a été démontré que la Dysferline jouait un rôle clé dans ce processus de réparation membranaire [102, 103].

La Dysferline est une large protéine (230 kDa) qui comprend un domaine transmembranaire en son C-terminal et sept domaines C2 dans sa portion cytoplasmique. Cette protéine a originalement été identifiée pour son homologie avec la protéine Fer-1 de *Caenorhabditis elegans* [30], responsable de la fusion des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique des spermatozoïdes [104]. La Dysferline est présente principalement à la membrane plasmique [105], mais est aussi retrouvée dans le cytoplasme [102] ou encore aux tubules transverses (tubules-t) durant le développement musculaire [106]. Des mutations au gène *Dysferline* engendrent différentes formes de dystrophies musculaires, regroupées sous le terme « dysferlinopathies », dont la LGMD2B [17, 30]. L'hypothèse qui prévaut est que le défaut primaire des dysferlinopathies soit un défaut de réparation membranaire, tel qu'il l'a été démontré *in vitro*. En provoquant, par irradiation laser, des microlésions sur des myofibrilles isolées de souris normales ou déficientes pour la Dysferline en présence de colorants imperméables aux membranes, Bansal *et al.* a étudié la cinétique de réparation membranaire en quantifiant l'augmentation intracellulaire du colorant [102]. Dans les cellules normales, l'entrée massive de colorant au niveau de la rupture était entravée en présence de calcium, montrant que la réparation de la rupture s'effectuait rapidement. Au contraire, en l'absence de la Dysferline, l'accumulation persistante de colorant à l'endroit de la lésion a suggéré que le processus de réparation membranaire était perturbé [102]. En étudiant la distribution de la Dysferline, Bansal *et al.* a par ailleurs

montré que celle-ci se relocalisait rapidement suite à une blessure au site de rupture chez des myotubes normaux, ce qui est cohérent avec un rôle pour la Dysferline dans la réparation membranaire [102]. Dans une étude indépendante, Lennon *et al.* a également montré de façon similaire que la réparation de la membrane était perturbée chez les cellules déficientes pour la Dysferline lorsque des myotubes en culture étaient lésés à l'aide d'une lame de scalpel [103]. Dans une expérience *in vivo*, Roche *et al.* a étudié la capacité des fibres musculaires à se rétablir suite à des blessures provoquées par de grandes contractions excentriques (« lengthening contractions ») [107]. Cette expérience a mis en évidence que les fibres des souris déficientes pour la Dysferline n'étaient pas plus susceptibles à développer des blessures que celles des souris de type sauvage ; par contre, les fibres lésées se rétablissaient moins efficacement et procédaient à la nécrose chez les souris déficientes pour la Dysferline, appuyant l'idée que la réparation membranaire était affectée chez celles-ci [107].

À la lumière de ces expériences, et vu l'homologie de la Dysferline avec Fer-1, il est suggéré que la Dysferline soit impliquée dans l'étape de la fusion des vésicules, entre elles et avec la membrane. Concordant avec cette hypothèse, la Dysferline est capable de lier les phospholipides de façon calcium-dépendante [108] via un de ses domaines C2. De plus, à l'instar des patients dysferlinopathiques, les fibres de souris déficientes en Dysferline ont montré à l'histologie des anomalies de la membrane, telles que des ruptures focales et une accumulation de vésicules subsarcolemmales [102]. Le processus de réparation membranaire dans lequel est impliqué la Dysferline est donc analogue à la réparation membranaire observée dans d'autres types cellulaires, en ce sens qu'il est dépendant du calcium, qu'il est rapide, et qu'il nécessite l'apport de membranes internes [109].

Le modèle courant de réparation membranaire via la Dysferline (**Figure 1.3**) propose que les lésions membranaires créent une zone enrichie en calcium autour du site de rupture. Des vésicules intracellulaires seraient aiguillonnées vers la membrane, et des événements de

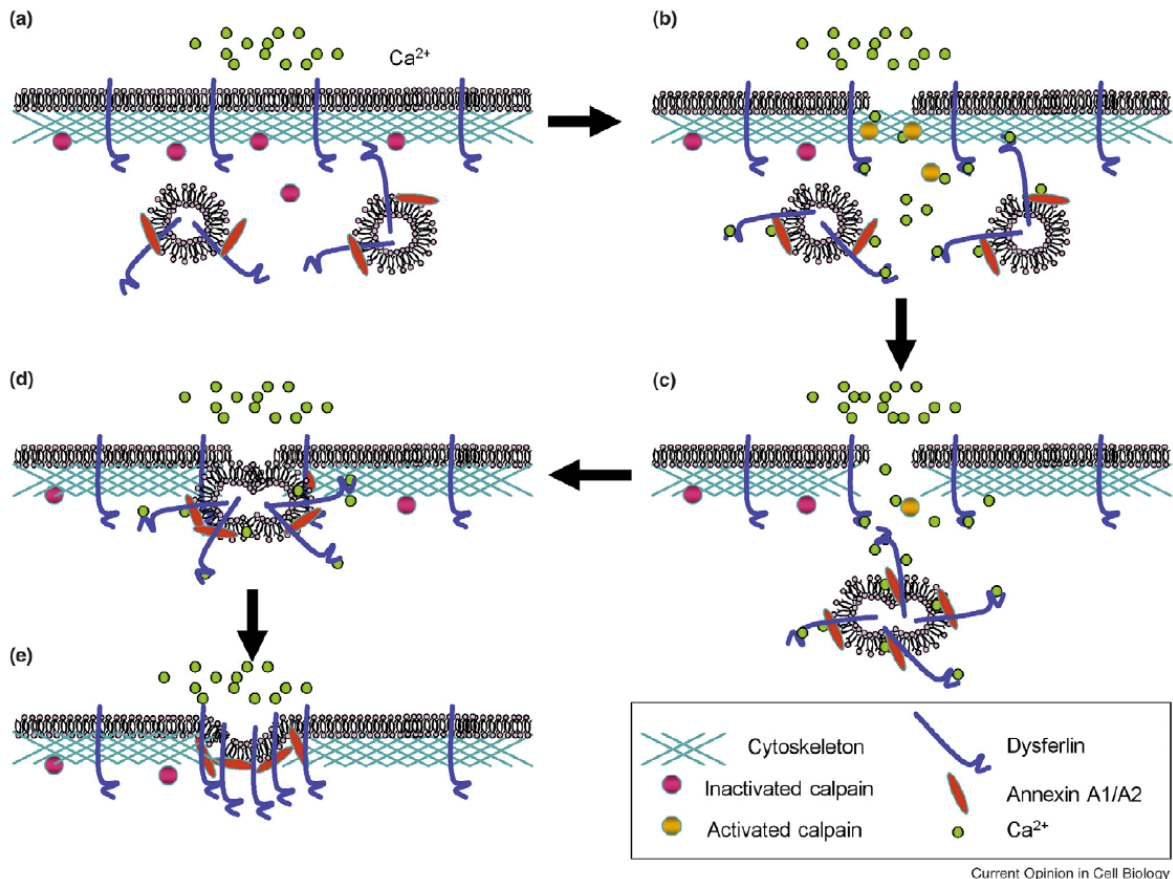


Figure 1.3 Modèle de réparation membranaire via la Dysferline

En conditions normales, la Dysferline est localisée au sarcolemme et dans des vésicules cytoplasmiques où elle interagit avec les Annexines A1/A2 (a). Une rupture dans la membrane provoque l'entrée de calcium (Ca^{2+}) dans le sarcoplasme et la création d'une zone dense en Ca^{2+} autour du site de rupture qui active des protéases comme la Calpaïne (b). La Calpaïne activée dégrade les protéines du cytosquelette, réduisant la tension membranaire (c). La concentration élevée de Ca^{2+} déclenche aussi l'agrégation des vésicules contenant la Dysferline, probablement grâce aux Annexines, leur migration vers le site de la lésion et leur fusion entre elles et avec la membrane (b-d). Les vésicules qui fusionnent s'enchâssent dans la membrane et forment une pièce scellante (« patch ») à l'endroit où il y avait une brèche.

Tiré de Han et Campbell, Curr Opin Cell Biol 2007 [110].

fusion permettraient de cacheter la rupture en formant une pièce scellante (« patch »). Ce processus exige de la cellule d'être capable de percevoir les changements provoqués par l'apparition de la rupture, par exemple en détectant l'entrée de calcium, de recruter des membranes sous forme de vésicules au site de la lésion, puis de fusionner les membranes pour colmater la brèche. D'autres protéines interviendraient ainsi à une étape ou l'autre de ce processus, telles les Annexines A1 et A2 [103, 111], localisées au sarcolemme et capables d'initier l'agrégation vésiculaire, puis la Cavéoline 3 (CAV3) et la Mitsugumine 53 (MG53) [112, 113], participant au trafic vésiculaire. MG53, par exemple, en liant le phosphatidylserine à la surface des vésicules pourrait faciliter le transport de celles-ci vers le site de rupture [113]. Chez les patients LGMD2B et MMD1, l'absence de la Dysferline empêche les membranes lésées de se refermer efficacement et par conséquent, affecte leur capacité de survivre. L'augmentation de nécrose qui s'en suit ferait progresser la dystrophie musculaire.

Par ailleurs, d'autres protéines interagissant avec la Dysferline ont été identifiées, bien que leur rôle dans le processus de réparation membranaire ne soit qu'hypothétique à ce stade : ANHAK est retrouvé dans la lumière des enlargeosomes [114], un compartiment qui pourrait être une source d'endomembranes [115], et interagit avec Dysferline [116], de même que la Calpaïne 3 qui co-précipite avec la Dysferline [117] et qui pourrait remodeler, par son activité protéase calcium-dépendante, plusieurs des composantes de la voie [118].

1.4 LGMD2L : Une nouvelle forme de LGMD avec atrophie du quadriceps

En 2007, nous avons publié la description clinique et la liaison au chromosome 11p12-p13 d'une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures, la LGMD2L (OMIM 611307), chez une cohorte comprenant huit familles canadiennes-françaises (**Annexe II**)

[119]. Cette cohorte incluait une grande famille consanguine (4 atteints, 3 non-atteints, 1 aasymptomatique; famille IX dans la publication de Jarry *et al.* [119], rebaptisée FC9 dans cet ouvrage-ci, pour « French-Canadian family » 9) que nous avons pu caractériser extensivement grâce à des études d'imagerie par résonance magnétique et d'histologie.

1.4.1 Présentation clinique

Chez cette famille FC9 (**Figure 1.4A**), l'absence d'histoire familiale sur plusieurs générations était compatible avec un mode de transmission récessif. À l'évaluation, les patients présentaient une dystrophie musculaire proximale, de type LGMD, avec une atteinte évidente des biceps brachii et particulièrement du quadriceps femoris (**Figure 1.4B, C**). L'âge du début des symptômes était variable, mais survenait à l'âge adulte (30-50 ans). Les niveaux sériques de créatine kinase (CK) étaient élevés (de 700 à 6000 U/L, comparativement au spectre normal de 37-217 U/L). Toujours dans cette grande famille, les hommes étaient affectés de façon plus importante que leur sœur, celle-ci étant asymptomatique, bien que son niveau de CK fût augmenté (1649 U/L) et qu'une légère faiblesse proximale ait été détectée à l'examen clinique effectué alors qu'elle était dans la soixantaine. La variabilité intrafamiliale était importante et un des frères (FC9-II :7) a dû recourir à l'usage d'un fauteuil roulant rapidement après le début de ses symptômes.

1.4.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Aux membres supérieurs, une légère atrophie et un remplacement graisseux du biceps brachii ont été observés. Aux membres inférieurs, l'atrophie et le remplacement graisseux étaient plus prononcés et particulièrement évidents au niveau des ischio-jambiers, de l'adductor magnus, du tensor fascia latae et du vastus lateralis du quadriceps (**Figure 1.4D, E**). Notons de plus l'asymétrie visible aux membres inférieurs.

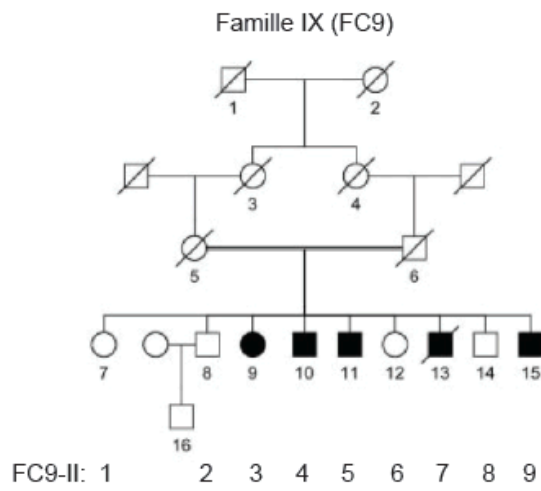
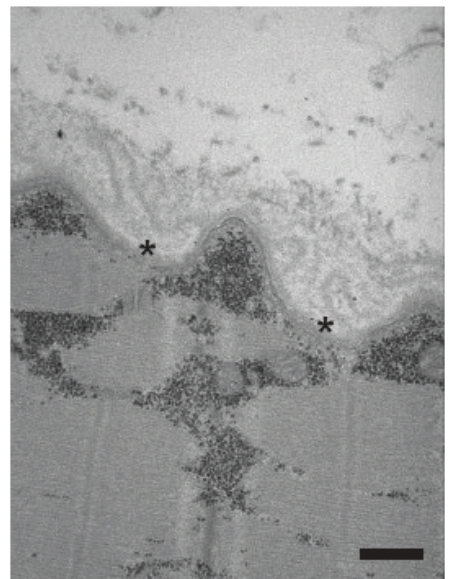
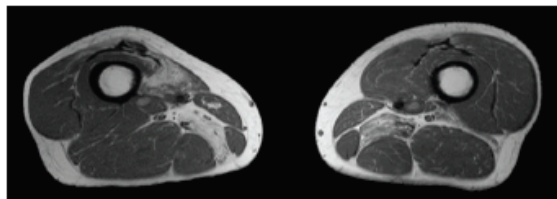
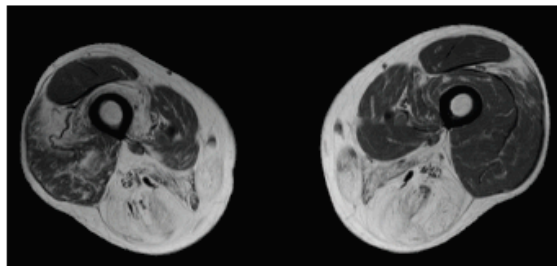
A**C****B****F****D****E**

Figure 1.4 Caractérisation du phénotype LGMD2L chez la famille FC9

(A) Pedigree de la famille FC9 (anciennement IX), en incluant sa nomenclature actuelle.

(B-C) Atrophie du biceps chez le patient FC9-II :5 (B) et du vastus medialis du quadriceps chez le patient FC9-II :9 (C).

(D-E) IRM des cuisses montrant l'atteinte asymétrique du vastus medialis et celle bilatérale des adductor magnus chez le patient FC9-II :9 (D) et l'atrophie importante et le remplacement graisseux des adductor magnus, des ischio-jambiers, de même que l'atteinte asymétrique du vastus lateralis, intermedius et medialis du quadriceps chez le patient FC9-II :5 (E).

(F) Microscopie électronique sur patient FC9-II :9 montrant des ruptures focales du sarcolemme (*) sans accumulation de vésicules sous-jacente. Barre : 10 μm .

Images tirées de Jarry et al., 2007 [119].

1.4.3 Pathologie et exclusions

L'étude histologique de la biopsie musculaire du patient FC9-II :9 a identifié des signes dystrophiques : variation de la taille des fibres, internalisation des noyaux et élargissement de l'endomysium. Une atrophie des fibres musculaires de type 1 et 2, sans prédominance ni regroupement, a aussi été démontrée. La microscopie électronique effectuée chez ce même patient a montré des duplications focales de la membrane basale et de multiples points de rupture du sarcolemme (**Figure 1.4F**), de même qu'une désorganisation de la matrice extracellulaire [119].

Toujours chez le patient FC9-II :9, les déficiences en Dystrophine, Dysferline (LGMD2B) et Sarcoglycanes (LGMD2C-F) ont été exclues par immunohistochimie et immunoblots. Également, le locus du gène de la LGMD2H, *TRIM32*, a été exclu chez toute la cohorte canadienne-française par une étude de liaison génétique [119].

1.4.4 Génétique

Une étude de liaison génétique effectuée sur la famille FC9 et sur une famille additionnelle, la famille FC8, de même qu'une cartographie fine réalisée en génotypant les huit familles de la cohorte, a identifié une liaison positive au chromosome 11p12-p13 pour la LGMD2L [119].

1.5 Projet de thèse

Les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD) sont reconnues comme un groupe génétiquement hétérogène : à ce jour 25 gènes/loci ont été associés à un sous-type, qu'il soit dominant (LGMD1A-H) ou récessif (LGMD2A-Q). Néanmoins, entre un et trois quarts

des patients qui se présentent en clinique avec une faiblesse progressive des membres proximaux est toujours sans diagnostic moléculaire, suggérant que d'autres gènes sont encore à identifier. Par ailleurs, comme pour la majorité des maladies neuromusculaires, il n'existe à ce jour aucun traitement. Le développement éventuel d'outils thérapeutiques passe nécessairement par une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques qui conduisent à la LGMD et par une meilleure connaissance des protéines en cause.

Notre programme de recherche d'identification de gènes mutés responsables de LGMD était basée sur ces deux prémisses : 1- Un nombre significatif de patients présentant une dystrophie proximale progressive est sans diagnostic moléculaire, 2- Le Québec possède beaucoup d'effets fondateurs locaux, ce qui facilite les recherches en génétique mendélienne. Depuis 1998, des patients et leurs familles, essentiellement canadiens-français, sont recrutés dans notre programme de recherche, sur la base d'un diagnostic de dystrophie musculaire des ceintures de type indéterminé.

À partir de quelques unes de ces familles, nous avons décrit une nouvelle forme de LGMD avec une importante atrophie du quadriceps, nommée LGMD2L, que nous avons associée à un locus du chromosome 11p12-p13, tel qu'introduit au chapitre 1.4. L'étude approfondie du plus petit intervalle n'a pas permis d'identifier le gène de la LGMD2L dans celui-ci.

Ce projet de thèse avait pour but d'identifier et de caractériser le gène muté responsable de la LGMD2L et s'est articulé autour de ces trois objectifs principaux :

1) Réduire/redéfinir l'intervalle candidat dans lequel se situerait le gène de la LGMD2L. Grâce à une approche combinée d'analyse de liaison et de cartographie par homozygotie sur une grande famille consanguine, nous avons redéfini le locus candidat au chromosome 11p14.3-p15.1, soit environ 12Mb en amont du locus préalablement défini. Le séquençage des gènes inclus dans cet intervalle a permis d'identifier la première mutation au gène

Anoctamine 5 (ANO5). Ces résultats sont présentés au **Chapitre 2** : Redéfinition du locus LGMD2L au chromosome 11p14.3-p15.1.

2) Identifier le gène muté qui cause la LGMD2L. Par séquençage d'un individu atteint pour chacune des familles incluses dans notre cohorte, nous avons identifié un total de trois mutations, dans autant de familles, au gène *ANO5* : une mutation faux-sens, une duplication d'une paire de base et une mutation d'épissage. Nous avons montré que ces deux dernières provoquaient la dégradation des transcrits qui en étaient porteurs. Grâce à une collaboration avec un groupe britannique, nous avons également identifié des mutations *ANO5* chez des patients atteints d'une dystrophie musculaire distale, nommée MMD3. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal *The American Journal of Human Genetics*, et sont présentés au **Chapitre 3** : Identification de mutations récessives au gène *Anoctamine 5* responsables des dystrophies musculaires LGMD2L et MMD3.

3) Caractériser la fonction du gène LGMD2L. *ANO5* code pour une protéine dont la fonction dans le muscle est inconnue, mais qui fait partie de la famille des Anoctamines (ANO) dont quelques membres sont des canaux chlores activés par le calcium. À l'aide de trois anticorps polyclonaux, nous avons tenté d'établir la localisation subcellulaire d'*ANO5* dans le muscle squelettique. Nous avons également montré que des isoformes d'épissage permettaient à une proportion de transcrits de reprendre le cadre de lecture chez un patient, en dépit du fait que celui-ci soit porteur homozygote de la mutation d'épissage. Cette complexité du processus d'épissage pourrait expliquer la préservation de la localisation d'*ANO5* chez ce patient. Ces résultats sont discutés au **Chapitre 4**, sous la forme d'un article en préparation : Un épissage alternatif préserverait la localisation d'*ANO5* chez un patient LGMD2L.

**CHAPITRE 2 - Redéfinition du
locus LGMD2L au chromosome
11p14.3-p15.1**

2.1 Introduction

Le recrutement de deux grandes familles canadiennes-françaises (FC8 et FC9) atteintes d'une dystrophie musculaire des ceintures de type indéterminé avec atrophie du quadriceps, nommée LGMD2L, a servi à réaliser une première analyse de liaison, effectuée avant mon arrivée au laboratoire. Cette analyse avait délimité le locus candidat pour LGMD2L au chromosome 11p12-p13 (Jarry *et al.* [119], **Annexe II**).

Toutefois, suite à l'étude approfondie de l'intervalle candidat publié, il est apparu que celui-ci présentait deux lacunes principales : 1) que la recherche de mutations par séquençage des gènes contenus dans l'intervalle se soit avérée infructueuse et 2) que les enfants de la famille FC9, bien qu'issus d'une boucle de consanguinité de premier degré, ne soient homozygotes que pour un marqueur de l'intervalle (voir Figure 5 de Jarry *et al.*, [119], **Annexe II**). Enfin, le statut d'une patiente de la famille FC8 a été revu et corrigé à « indéterminé », du fait que l'évaluation neuromusculaire de celle-ci avait été restreinte en raison de sa démence, et que la faiblesse musculaire qu'elle présentait était considérablement plus légère que celles de son frère et de sa sœur atteints.

Pour redéfinir le locus candidat et identifier les mutations responsables de la LGMD2L, nous avons procédé à une seconde étude de liaison, cette fois en tenant compte du statut modifié de la patiente FC8, et avons opté pour une analyse d'homozygotie SNPs pour raffiner l'étendue de cet intervalle.

2.2 Méthodes

Patients et spécimens

Tous les patients et les familles ont été recrutés aux hôpitaux Notre-Dame et St-Luc du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) et à la Clinique neuromusculaire du Centre de réadaptation Lucie-Bruneau, et examinés par des neurologues expérimentés (B. Brais, M.-F. Rioux). Le consentement écrit de tous les sujets a été obtenu préalablement à leur recrutement. Le consentement et le protocole de recherche ont reçu l'approbation du Comité d'éthique de la recherche du CHUM. L'ADN a été extrait à partir d'échantillons sanguins par des méthodes standards d'isolation, soit par une méthode préalablement décrite (Zelinski 1991), soit à l'aide du kit Gentra Puregene (Qiagen, Hilden, Allemagne). Pour obtenir l'ARN à partir de biopsies musculaires, un échantillon préalablement congelé rapidement dans l'azote liquide (« snap-frozen ») a été broyé à l'aide d'un pilon dans l'azote liquide, puis déposé dans 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Pour isoler l'ARN à partir du sang, les cellules lymphocytes ont d'abord été isolées du sang total à l'aide du système Accuspin-Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), rincées deux fois au PBS, puis resuspendues dans 1 mL de Trizol. L'extraction d'ARN a été effectuée pour tous les échantillons en suivant le protocole du fabricant.

Génotypage

Le criblage du génome sur 500 marqueurs microsatellites (densité de 8 cM) a été effectué en utilisant les services de DeCODE Genetics (Reykjavik, Islande). Le criblage du génome par polymorphismes de nucléotides simples (SNPs) a été effectué au Centre d'Innovation Génome Québec – Université McGill (Montréal, Canada) en utilisant la micropuce HumanHap300 de Illumina (San Diego, CA). Pour la cartographie fine au chromosome 11p14.3-p15.1, le génotypage de marqueurs microsatellites a été réalisé en concevant des paires d'amorces dont l'amorce sens était prolongé d'une séquence m13 en 5' (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3'). L'amplification par PCR était faite en présence des

deux amorces, ainsi que d'un oligo m13 marqué à la fluorescence (FAM, VIC, NED ou PET) en 5'. La liste des amorces est disponible en **Annexe IV**. Les réactions PCR étaient faites à partir de 80 ng d'ADN génomique, dans un mélange comprenant 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq (Qiagen) et son tampon, 0,06 μM de l'amorce sens, 0,2 μM de l'amorce anti-sens, et 0,2 μM de l'amorce m13 marquée à la fluorescence dans un volume final de 10 μL . Les conditions d'amplification étaient les suivantes : Une dénaturation initiale de 95°C pour 5 min, suivie de 5 cycles (95°C, 30 sec / 68°C, 30 sec / 72°C, 30 sec), puis de 30 cycles (95°C, 30 sec / 55°C, 30 sec / 72°C, 30 sec), puis de 8 cycles (95°C, 30 sec / 53°C, 30 sec / 72°C, 30 sec), et enfin d'une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits PCR ont été dilués entre 1/100 et 1/400 dans un mélange de formamide et du marqueur de poids moléculaire GeneScan 500-LIZ (Applied Biosystems). Les fragments PCR ont été migrés soit au Centre d'Innovation Génome Québec – Université McGill, soit au laboratoire de Guy A. Rouleau (Montréal, Canada), sur un bioanalyseur 7900 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), puis analysés à l'aide de GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems).

Analyses de liaison et d'homozygotie

Les analyses de liaison ont été réalisées et les LOD score calculés à l'aide de GeneHunter v.2.1 en suivant ces paramètres : modèle récessif avec pénétrance à 100%, fréquence de l'allèle muté à 0.03, fréquences égales de chaque allèle. La visualisation première des régions d'homozygotie SNP a été effectuée sur BeadStudio (Illumina) et la détermination exacte de ces régions à l'aide du logiciel AutoSNPa [120], en fixant le seuil de détection à 100 SNPs consécutifs et en allouant un maximum d'un SNP hétérozygote dans la région.

Séquençage

Des amorces ont été conçues à l'aide du programme Primer 3 Plus pour amplifier chaque exon, en incluant au moins 30 pb des introns flanquants, pour générer des produits PCR d'une taille maximum de 900 pb. Dans le cas où un exon comptait 800 pb ou plus, l'exon

était scindé en autant de réactions PCR que nécessaires, tout en s'assurant un chevauchement d'au moins 50 pb entre les différentes réactions PCR. La liste des amorces utilisées pour le séquençage du gène *ANO5* est disponible en **Annexe IV**. Les réactions PCR étaient faites à partir de 100 ng d'ADN génomique, dans un mélange comprenant 1X de solution-Q (Qiagen), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,05 U/ µL de Taq (Qiagen) et son tampon, et 0,2 µM de chaque amorce dans un volume final de 25 µL. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : Une dénaturation initiale de 94°C pour 5 min, suivie de 5 cycles (94°C, 30 sec / 65°C, 30 sec / 72°C, 30 sec à 1 min 30 sec), puis de 5 cycles (94°C, 30 sec / 62°C, 30 sec / 72°C, 30 sec à 1 min 30 sec), puis de 20 à 30 cycles (94°C, 30 sec / 58°C, 30 sec / 72°C, 30 sec à 1 min 30 sec), et enfin d'une élongation finale de 5 min à 72°C. Après vérification de 5 µL sur gel d'agarose 1,5%, l'excédent des produits PCR a été envoyé pour séquençage au Centre d'Innovation Génome Québec – Université McGill. Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel SeqMan de la suite Lasergene (DNASTar, Madison, WI) et du logiciel Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, PA). Les séquences références qui ont servi à aligner et comparer les séquences des patients ont été téléchargées à partir du fureteur du génome de l'Université de Californie Santa Cruz (UCSC Genome browser) et de GenBank du National Centre for Biotechnology Information (NCBI).

RT-PCR

Préalablement à la réaction de transcriptase inverse (RT), de 1 à 3 µg d'ARN étaient digérés à la DNase I (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) en suivant les spécifications du manufacturier. La réaction RT a été effectuée à l'aide du kit Superscript III (Invitrogen) : de 4 à 6 µL de l'ARN digéré a été mélangé à 50 µg d'hexamers (« random hexamers ») et 0,5 mM de dNTPs dans un volume de 10 µL, puis dénaturé à 65°C pour 5 min, et refroidi sur glace pour 1 min, avant d'ajouter le tampon (concentration finale de 1X), 5 mM de MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U de RNaseOUT et 200 U de SuperScript II RT dans un volume final total de 20 µL. La synthèse de l'ADNc s'est faite selon ces

conditions : 25°C pour 10 min, 50°C pour 50 min, puis 85°C pour 5 min. L'échantillon était refroidi sur glace avant d'ajouter 1 µL de RNase H à 37°C pour 20 min. La réussite de la réaction RT a été déterminée en amplifiant les ADNc avec d'une paire d'amorces au gène GAPDH. Cette amplification a été réalisée en utilisant la polymérase Taq Advantage 2 (Clontech, Mountain View, CA). L'ADNc (1 µL) a été mélangé au tampon Advantage 2 (concentration finale de 1X), 0,15 mM de dNTPs, 0,15 µM de chaque amorce et de 0,15 µL de la Taq Advantage 2 (50X), dans un volume final de 10 µL. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pour 1 min, suivie de 5 cycles (95°C, 30 sec / 68°C, 25 sec à 1 min 30 sec), puis de 5 cycles (95°C, 30 sec / 64°C, 30 sec / 68°C, 25 sec à 1 min 30 sec), puis de 20 à 30 cycles (95°C, 30 sec / 60°C, 30 sec / 68°C, 25 sec à 1 min 30 sec), et enfin d'une élongation finale de 1min à 68°C. Pour le séquençage d'*ANO5* à partir de l'ADNc, les réactions PCR ont été augmentées à l'échelle dans un volume final de 25 µL, afin d'envoyer au moins 20 µL du produit PCR au séquençage, tel qu'indiqué plus haut. Les séquences de toutes les amorces utilisées sont disponibles en **Annexe IV**.

Séquençage génomique d'*ANO5*

Le séquençage de la région génomique complète du gène *ANO5* (UTRs, exons et introns, 90 kb) a été réalisé au Centre d'Innovation Génome Québec – Université McGill.

Tests génétiques (*DYSF* et *DOK7*)

Les échantillons d'ADN sont envoyés au Utah Genome Center, University of Utah (Salt Lake City, UT), qui effectue le test génétique pour *Dysferline* par séquençage génomique de la région codante. Le test pour *DOK7* est effectué au laboratoire par séquençage génomique de la région codante (**Annexe III**, [121]).

Ressources web

Fureteur du génome UCSC (incluant GNF Gene Expression Atlas 2)

<http://genome.ucsc.edu/>

National Centre for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

GeneCards <http://www.genecards.org/>

GeneHunter <http://linkage.rockefeller.edu/soft/gh/>

GeneNote http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/home_page.pl

Primer 3 Plus <http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>

2.3 Résultats

Une seconde analyse de liaison et une cartographie par homozygotie redéfinissent l'intervalle candidat pour LGMD2L

Afin d'identifier la région génomique où se localiserait le gène muté responsable de la LGMD2L, deux familles canadiennes-françaises ont été sélectionnées pour un criblage à l'échelle du génome (500 marqueurs microsatellites, densité de 8 cM) (**Figure 2.1A**). Une première analyse de liaison avait ciblé un locus de 52,2 Mb au chromosome 11 (entre les marqueurs D11S4080 et D11S937, **Figure 2.1B**), puis une cartographie fine réalisée en génotypant six familles additionnelles dans cette région avait défini le locus au chromosome 11p12-p13 (**Figure 2.1C**), tel que décrit dans Jarry *et al.* (**Annexe II**, [119]). Les exons et frontières exon-intron des huit gènes contenus dans cet intervalle (**Figure 2.1C**) ont été séquencés et n'ont révélé aucune mutation.

Compte tenu de l'absence de mutation au locus 11p12-p13 et de la faible étendue des régions d'homozygotie pour les patients issus de l'union consanguine (famille FC9, voir Figure 5 de Jarry *et al.* (**Annexe II**, [119])), nous avons procédé à une ré-analyse de liaison, cette fois en modifiant le statut de l'individu FC8-II:1 (de « atteint » à « indéterminé »). Cette seconde analyse a une fois de plus identifié le LOD score le plus élevé au chromosome 11 (LOD=1,87 au marqueur D11S4080), mais a renvoyé à un plus grand intervalle candidat de 59,2 cM (60,4 Mb) entre les marqueurs D11S902 et D11S937 (**Figure 2.1D**).

Afin de raffiner la définition de l'intervalle candidat, nous avons opté pour une stratégie de cartographie par homozygotie, en se basant sur l'hypothèse de la présence de mutations homozygotes chez les patients de la famille consanguine. Nous avons également tiré profit du génotypage de polymorphismes de nucléotide simple (SNPs) à l'échelle du génome pour

Figure 2.1 Redéfinition de l'intervalle candidat LGMD2L pour deux familles canadiennes-françaises

(A) Pedigrees des familles canadiennes-françaises FC8 et FC9. La famille FC9 est consanguine au premier degré. Le statut de la patiente FC8-II :1 est inconnu (?), celui de la patiente FC9-II :3 est asymptomatique (barre noire). Les individus dont l'ADN a été envoyé pour génotypage microsatellite à l'échelle du génome sont indiqués par un astérisque noir, ceux dont l'ADN a été envoyé pour un génotypage SNPs à l'échelle du génome sont indiqués par l'astérisque vert.

(B) Graphique du LOD score en fonction de la position génétique dans le génome, représentée par le numéro des chromosomes (panneau du haut) et en fonction de la position génétique sur le chromosome 11 (panneau du bas). L'analyse de liaison globale des génotypes microsatellites pour les familles FC8 et FC9 en définissant le statut de la patiente FC8-II :1 à atteint (disque noir) renvoie le LOD le plus élevé au chromosome 11, entre les marqueurs D11S4080 et D11S937 pour une région de 52,2 Mb.

(C) La cartographie fine réalisée en saturant cette région de 52,2 Mb de marqueurs microsatellites génotypés sur 8 familles canadiennes-françaises (en incluant FC8 et FC9) a réduit l'intervalle candidat à une région de 1,4 Mb au chromosome 11p12-p13 (trait rouge). Représentation graphique des gènes contenus dans cet intervalle selon le fureteur du génome UCSC (assemblage mars 2006).

(D) La reprise de l'analyse globale de liaison (voir B), en définissant cette fois le statut de la patiente FC8-II :1 à inconnu (disque gris) renvoie le LOD score le plus élevé au chromosome 11, à une région de 60,4 Mb entre les marqueurs D11S902 et D11S937.

(E) La cartographie fine réalisée en recherchant les régions d'homozygotie SNPs partagées uniquement par trois atteints de la famille FC9 a réduit l'intervalle à une région de 4,7 Mb au chromosome 11p14.3-p15.1 (trait vert). Les 12 gènes inclus dans cet intervalle sont représentés par le fureteur du génome UCSC (assemblage mars 2006).

rechercher avec une plus grande résolution une région d'homozygotie chez les patients de la famille consanguine. Au total, cinq individus de la famille FC9 (trois atteints : FC9-II:3, FC9-II:5, FC9-II:9, deux non-atteints : FC9-II:6, FC9-II:8) ont été sélectionnés pour le génotypage SNP à l'aide de la micropuce HumanHap300 (317 503 SNPs répartis à travers le génome). La recherche des régions d'homozygotie partagées uniquement par les individus atteints en utilisant comme seuil de détection 100 SNPs homozygotes consécutifs a identifié 3 régions (**Tableau 2.1**), dont la plus large se situait au chromosome 11 (616 SNPs consécutifs entre les marqueurs rs4073508 et rs10834273, 4,7 Mb). Cette région d'homozygotie était par ailleurs localisée à l'intérieur des bornes de l'intervalle de 60,4 Mb (**Figure 2.1E**) et 11,9 Mb en amont du locus 11p12-p13.

Séquençage de gènes candidats au chromosome 11p14.3-p15.1

L'intervalle minimal au chromosome 11p14.3-11p15, tel que déterminé par l'analyse d'homozygotie, englobait 12 gènes (*SVIP*, *GAS2*, *FANCF*, *SLC17A6*, *ANO5*, *IDH3GL*, *NELL1*, *SLC6A5*, *PRMT3*, *HTATIP2*, *DBXI*, *NAV2*, **Figure 2.1E**). Aucun de ces gènes n'avait de fonction connue ni même prédite dans le muscle squelettique, mais 10 y sont exprimés de façon forte (*SLC17A6*, *ANO5*, *DBXI*), modérée (*GAS2*, *FANCF*, *NELL1*,

Tableau 2.1 Régions d'homozygotie de plus de 100 SNPs consécutifs partagées uniquement par trois atteints de la famille consanguine FC9.

Chromosomes	SNP flanquants en 5'		SNP flanquants en 3'		Distances (Mb)
	SNP ID	Positions (pb)	SNP ID	Positions (pb)	
11	rs4073508	19 369 237	rs10834273	24 048 258	4,7
10	rs7091927	68 619 603	rs2487707	70 435 098	1,8
6	rs200997	27 919 794	rs7767008	28 738 772	0,8

SLC6A5, *PRMT3*, *NAV2*) ou faible (*HTATIP2*), selon les données GNF Gene Expression Atlas 2 et GeneNote (accessibles par le fureteur du génome UCSC et la base de données GeneCards).

Les exons et les frontières exon-intron de cinq gènes (*SVIP*, *GAS2*, *FANCF*, *SLC17A6*, *ANO5*) ont d'abord été séquencés pour deux patients (FC8-II:4 et FC9-II:9). *SVIP* (small VCP/p97-interacting protein) est une protéine à fonction inconnue localisée en périphérie des membranes. *GAS2* (Growth-arrest specific protein 2) est clivé durant l'apoptose, entraînant une réorganisation des filaments d'actine, et peut inhiber la Calpaïne. *FANCF* (Fanconi anemia, complementation group F) est impliquée dans la réparation de l'ADN. *SLC17A6* est un cotransporteur sodium/anionique retrouvé dans les vésicules présynaptiques et fait partie de la famille des transporteurs vésiculaires de glutamate. *ANO5* est une protéine transmembranaire à fonction inconnue et mutée dans une forme de dysplasie gnathodiaphyseale. À l'analyse du séquençage de ces cinq candidats, plusieurs polymorphismes connus ont été décelés, mais une seule mutation potentielle a été identifiée, soit une substitution d'une cytosine pour une guanine à l'exon 13 du gène *ANO5* pour le patient de la famille FC9. La caractérisation de cette mutation sera approfondie au chapitre suivant.

2.4 Conclusion

Le recrutement de deux grandes familles informatives atteintes d'une dystrophie musculaire des ceintures a permis de réaliser une première étude de liaison et d'identifier un locus candidat au chromosome 11 (52,2 Mb). Toutefois, un statut erroné (individu FC8-II:1) avait réduit de façon prématurée l'étendue réelle de l'intervalle candidat. La seconde analyse de liaison en tenant compte du statut modifié a renvoyé à un plus grand intervalle candidat, toujours au chromosome 11 (60,4 Mb).

La cartographie fine par recherche d'homozygotie de SNPs chez les patients de la famille consanguine FC9 présentait plusieurs avantages : 1) Cette stratégie de cartographier par homozygotie nous permettait de tester l'hypothèse de la présence de mutations homozygotes chez ces individus; 2) La disponibilité des micropuces de génotypage SNPs et leur tarifs devenus abordables nous permettaient de localiser avec une plus grande résolution les régions d'homozygotie, compte tenu de la plus grande abondance de marqueurs SNPs que de microsatellites dans le génome humain; 3) Enfin, cette stratégie de ne tenir compte que d'un nombre restreint de familles (dans ce cas, une seule) pour réduire l'intervalle avait pour avantage de ne pas être sensible à l'hétérogénéité génétique, contrairement à la cartographie fine par génotypage de plusieurs familles additionnelles. Cette cartographie par homozygotie a finalement réduit l'intervalle candidat à une région de 4,7 Mb au chr11p14.3-p15.1, soit 11,9 Mb en amont de l'intervalle initial au chr11p12-p13.

Par séquençage de gènes candidats au chr11p14.3-p15.1, une première mutation au gène *ANO5* a été identifiée dans une grande famille consanguine (FC9). Cette découverte souligne une fois de plus la richesse offerte par les grandes familles lors des études de liaison génétique, de même que l'efficacité d'une approche de cartographie par homozygotie en présence de familles consanguines [122].

**CHAPITRE 3 - Identification de
mutations récessives au gène
Anoctamine 5 responsables des
dystrophies musculaires LGMD2L
et MMD3 (*Recessive mutations in the
putative calcium-activated chloride
channel Anoctamin 5 cause proximal
LGMD2L and distal MMD3 muscular
dystrophies*)**

3.1 Contribution des co-auteurs

V.B. a manipulé les échantillons canadiens-français (extractions d'ADN et d'ARN), a réalisé l'analyse d'homozygotie SNP et le séquençage de gènes candidats, a identifié les premières mutations au gène *ANO5*, a séquencé toute la cohorte canadienne-française, a génotypé les contrôles canadiens-français, a réalisé l'expérience de dégradation d'ARN (« essais NMD »). Elle a produit les figures 1, 2d et 3, le tableau S1, la première écriture du manuscrit et a participé à la révision de celui-ci.

G.M. a manipulé les échantillons européens, a réalisé les analyses de liaison pour l'intervalle candidat MMD3, a séquencé *ANO5* pour les patients européens, a génotypé les chromosomes contrôles européens. Il a produit la figure 2 (à l'exception de 2d).

K.M.B. a évalué en clinique et a référé la famille FC31 et a participé à l'élaboration du tableau S1.

K.S. a analysé par séquençage les patients européens pour les gènes de l'intervalle du chr11p12-p13.

H.I., M.I., K.M. et N.K. ont développé les premiers anticorps polyclonaux α -ANO5.

Y.R. a produit et analysé les images de microscopie électronique du patient FC9-II-9.

L.P. a fourni une expertise en électrophysiologie et a participé à la révision du manuscrit.

J.K. et I.R. ont analysé par séquençage des gènes de l'intervalle candidat MMD3 chez les familles européennes.

F.B., W.H.J.P.L. et M.deV. ont évalué et caractérisé cliniquement la famille IV. **M.deV.** a participé à l'élaboration du tableau S1.

I.M. a évalué et caractérisé cliniquement la famille H, a participé à l'élaboration du tableau S1 ainsi qu'à la révision du manuscrit.

R.B. a supervisé le projet MMD3, a participé à l'écriture et la révision du manuscrit.

B.B. a supervisé le projet LGMD2L, a recruté et évalué les familles canadiennes-françaises, de même qu'il a participé à l'écriture et la révision du manuscrit.

3.2 Report in The American Journal of Human Genetics

Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies

Véronique Bolduc^{1,13}, Gareth Marlow^{2,13}, Kym M Boycott³, Khalil Saleki², Hiroshi Inoue⁴, Johan Kroon², Mitsuo Itakura⁴, Yves Robitaille⁵, Lucie Parent⁶, Frank Baas⁷, Kuniko Mizuta⁸, Nobuyuki Kamata⁸, Isabelle Richard⁹, Wim Linssen¹⁰, Ibrahim Mahjneh¹¹, Marianne de Visser¹², Rumaisa Bashir², Bernard Brais^{1*}

Published online January 21th, 2010

The American Journal of Human Genetics 86, 213-221 (2010)

¹Laboratoire de neurogénétique de la motricité, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec H2L 4M1, Canada; ²School of Biological and Biomedical Sciences, University of Durham, Durham DH1 3LE, UK; ³Department of Genetics, Children's Hospital of Eastern Ontario, Ottawa, Ontario K1H 8L1, Canada; ⁴Institute for Genome Research, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan; ⁵CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada; ⁶Département de physiologie, Groupe d'Étude sur les Protéines Membranaires, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada; ⁷Department of Neurogenetics, Academic Medical Center, The Netherlands; ⁸Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Cervico-Gnathostomatology, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima 734-8553, Japan; ⁹Généthon, CNRS UMR8587 LAMBE, 91000 Évry, France; ¹⁰Department of Neurology, Lucas Andreas Ziekenhuis, 1006 AE Amsterdam, The Netherlands; ¹¹Department of Neurology, University of Oulu and MHSO Hospital, Pietarsaari, Finland; ¹²Department of Neurology, Academic Medical Center, The Netherlands; ¹³These authors contributed equally to this work.

*Contact information: Bernard Brais, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Building Mailloux, Door M4211-L, 1560 Sherbrooke East, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1. Tel. 1-514-890-8000 (ext. 25560), Fax: 1-514-412-752.

Abstract

The recently described human anion channel Anoctamin (ANO) family comprises at least 10 proteins, many of which have been shown to correspond to calcium-activated chloride channels. To date, the only reported human mutations in this family of genes are dominant mutations in *ANO5* (*TMEM16E*, *GDD1*) in the rare skeletal disorder: gnathodiaphyseal dysplasia (GDD). We have identified recessive mutations in *ANO5* that result in a proximal limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2L) in three French-Canadian families and in a distal non-dysferlin Miyoshi myopathy (MMD3) in Dutch and Finnish families. These mutations consist of a splice site, one base pair duplication shared by French-Canadian and Dutch cases and two missense mutations. The splice site and the duplication mutations introduce premature termination codons and consequently trigger nonsense-mediated mRNA decay (NMD), suggesting an underlining loss-of-function mechanism. The LGMD2L phenotype is characterized by proximal weakness with prominent asymmetrical quadriceps femoris and biceps brachii atrophy. The MMD3 phenotype is associated with distal weakness in particular of calf muscles. On electron microscopy, multifocal sarcolemmal lesions were observed in both phenotypes. The phenotypic heterogeneity associated with *ANO5* mutations is reminiscent of that observed with Dysferlin (*DYSF*) mutations that can cause both LGMD2B and Miyoshi myopathy (MMD1). In one MMD3 affected individual, defective membrane repair was documented on fibroblasts by membrane resealing ability assays as observed in dysferlinopathies. Though the function of ANO5 protein is still unknown, its putative calcium-activated chloride channel function may lead to important insights into the role of deficient skeletal muscle membrane repair in muscular dystrophies.

Results and Discussion

Muscular dystrophies encompass a large and diverse group of inherited diseases defined by skeletal muscle weakness and atrophy. Amongst these, the limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) represent a group of both dominant and recessive disorders characterized by predominant proximal limb muscles weakness with eighteen known causal genes [9, 44]. The majority of the proteins involved in LGMD are important for maintaining the integrity of the sarcolemmal membrane, which is susceptible to injury because of the high mechanical stress imposed on muscle fibers during muscle contraction [9, 123]. Some of the implicated proteins, such as the Sarcoglycans (LGMD2C-2F [MIM 253700, 608099, 604286, 601287]), when mutated disrupt the normal structure and hence the stability of the membrane [124]. Another group of mutated proteins, such as Dysferlin [MIM 603009] (LGMD2B [MIM 253601]) and Caveolin-3 [MIM 601253] (LGMD1C [MIM 607801]), play a role in the repair of damaged muscle membrane through a process that requires the recruitment of cytoplasmic vesicles to the membrane wound site and their fusion by exocytosis to form a patch membrane [102, 109, 110, 112]. The distal myopathies are also a large group of muscular dystrophies with more than ten genes identified to date characterized by initial distal limb weakness [125]. In the cases of dysferlinopathies, both a proximal LGMD2B phenotype and a distal Miyoshi myopathy phenotype (MM [MIM 254130]) are caused by mutations in the Dysferlin (*DYSF*) gene [17, 30, 126].

The human Anoctamins (ANO) compose a family of at least 10 proteins all exhibiting eight transmembrane domains and a DUF590 domain of unknown function [127, 128]. Recently *ANO1* [MIM 610108], *ANO2* [MIM 610109], *ANO6* [MIM 608663], *ANO8* [MIM 610216] and *ANO9* have been recognized to code for the elusive calcium-activated chloride channels (CaCC) [129-134], however the function of *ANO5* [MIM 608662] is unknown. In

this study we report that recessive mutations in Anoctamin 5 (*ANO5*) cause both a proximal muscular dystrophy, LGMD2L [MIM 611307], and the distal Miyoshi myopathy MMD3.

A previous study mapped LGMD2L, a novel recessive form of LGMD associated with prominent asymmetrical quadriceps femoris and biceps brachii atrophy, to chromosome 11p12-p13 in a cohort of French-Canadian (FC) families [119]. SNP genotyping using the Illumina HumanHap300 beadchip (317 503 SNPs; Illumina, San Diego, CA, USA) was performed on the previously reported single large consanguineous FC Family FC9 [119] (**Figure 3.1A**) at the McGill University and Genome Québec Innovation Centre genotyping platform. Homozygosity analysis via AutoSNPa [120] identified a 4.7Mb region of homozygosity on chromosome 11p14.3-p15 (616 consecutive SNPs delimited by rs4073508 and rs10834273). This new region shifted telomerically by 11.9Mb the previous published candidate interval (11p12-p13) [119]. This region contained 11 annotated genes: *NAV2* [MIM 607026], *DBX1*, *HTATIP2* [MIM 605628], *PRMT3* [MIM 603190], *SLC6A5* [MIM 604159], *NELL1* [MIM 602319], *ANO5/TMEM16E*, *FANCF* [MIM 603467], *GAS2* [MIM 602835], *SLC17A6* [MIM 607563], and *SVIP*. The exons and intron-exon junctions were sequenced for five of these genes: *ANO5/TMEM16E*, *FANCF*, *GAS2*, *SLC17A6*, and *SVIP*. Mutations were identified in *ANO5/TMEM16E* in family FC9. Though the sequencing of *ANO5* exons and intron-exon borders in the seven remaining families of the original cohort [119] did not identify mutations, the screening of two new FC LGMD2L families identified other mutations in *ANO5*. Informed consent approved by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal ethics committee was obtained for all participants. In Family FC9 we identified a homozygous nucleotide substitution (c.1295C>G) in genomic DNA which creates a putative splice donor site within exon 13 as calculated by NetGene2 and Human Splicing Finder v2.4 (**Figure 3.1A** and **3.1B**). Amplification and sequencing of patient muscle cDNA confirmed the aberrant splicing of exon 13 that results in the deletion of the last 38 nucleotides of this exon (**Figure 3.1C** and **3.1D**), leading to a frameshift and a predicted premature truncation (p.Ala432GlyfsX49). Segregation of this

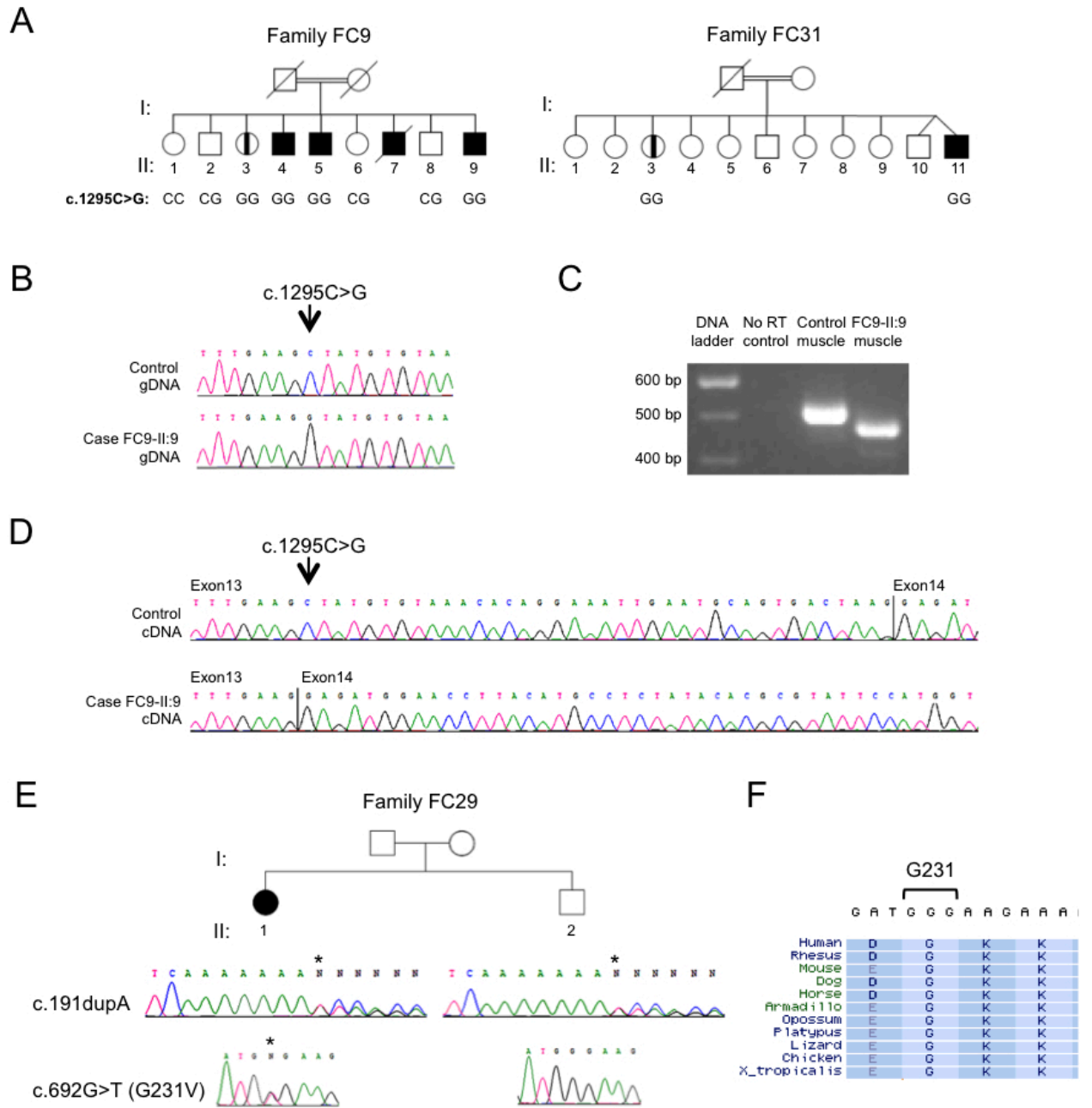


Figure 3.1 Identification of *ANO5* mutations in French-Canadian LGMD2L families

(A) Pedigrees of LGMD2L families FC9 and FC31. Parents of the two families are first-degree cousins. Genotypes for the c.1295C>G variant are indicated below the individuals for whom DNA was available. Family FC9 has been described earlier [119].

(B) Genomic sequence chromatogram of exon 13 in patient FC9-II:9 reveal an exonic substitution (c.1295C>G). Sequencing of *ANO5* in the two families in (A) confirmed that affected individuals FC9-II:3, FC9-II:4, FC9-II:5, FC31-II:3 and FC31-II:11 were also homozygous for the mutation.

(C) cDNA amplicons of *ANO5* exons 10 to 15 from muscle RNA samples for patient FC9-II:9 and a control individual.

(D) Sequence chromatograms of the cDNA amplicons in (C) in the region of the nucleotide c.1295.

(E) Pedigree of LGMD2L family FC29. Genomic sequence chromatograms show that patient FC29-II:1 is compound heterozygote for two exonic variants: a one-bp duplication in exon 5 (c.191dupA) and a missense mutation in exon 8 (c.692G>T/G231V). Her unaffected brother is a carrier for the c.191dupA.

(F) Protein alignment of the G231 residue in *ANO5* using Multiz.

variant in Family FC9 was confirmed by sequencing the genomic DNA of exon 13 in all siblings (**Figure 3.1A**). The same mutation was identified in homozygosis state in the two cases belonging to the FC Family FC31 (**Figure 3.1A**). The two families are not known to be related and come from different regions, but share a six STR markers haplotype (covering 3.6Mb) suggesting that it is the same historical mutation that segregates in these families (data not shown). The third LGMD2L FC Family FC29 was heterozygous for two other variants: c.191dupA in exon 5 (p.Asn64LysfsX15), and c.692G>T in exon 8 (p.G231V) (**Figure 3.1E**). The G231 residue is evolutionary conserved (**Figure 3.1F**) and is predicted to be located in the putative intracellular N-terminal tail (**Figure 3.2D**). Sequencing of the entire 87kb genomic region of *ANO5* is underway to identify mutations in other FC LGMD families.

Further evidence that *ANO5* mutations cause muscular dystrophy came from an independent study of families presenting with a distal non-dysferlin Miyoshi myopathy. Informed consents approved by the Kainuu Central Hospital (Finland), the Academic Medical Centre (The Netherlands) and the University of Durham (United Kingdom) ethical committees were obtained for these families. Two Miyoshi myopathy families, in which mutations in *DYSF* and linkage to the 10p MMD2 locus had been excluded [135], were genotyped via the Affymetrix GeneChip Human Mapping 50k (performed by AROS Applied Biotechnology, Aarhus Nord, Denmark). They were linked to a Miyoshi myopathy (MMD3) locus on chromosome 11p14.3-cen (rs722490 to rs509244, cumulative LOD score of >2.5) overlapping with the LGMD2L candidate region [119] (data not shown). Sequencing of the *ANO5* gene identified mutations in both families. In the Finnish Family H [136], a homozygous nucleotide substitution (c.2272C>T) was identified in exon 20 that leads to the substitution of a conserved arginine to a cysteine residue (R758C, **Figure 3.2A**). The same heterozygote exon 5 mutation (c.191dupA) observed in the FC Family FC29 (**Figure 3.1E**) was found in a homozygous state in the Dutch Family IV [135]

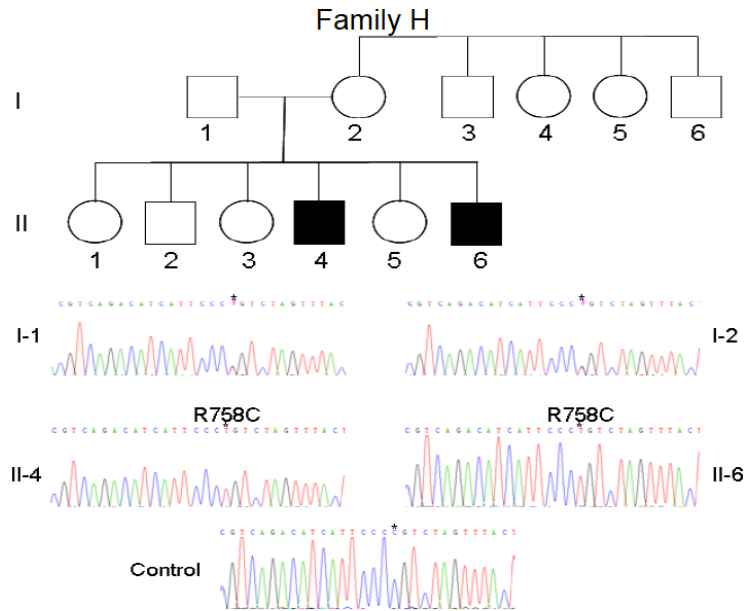
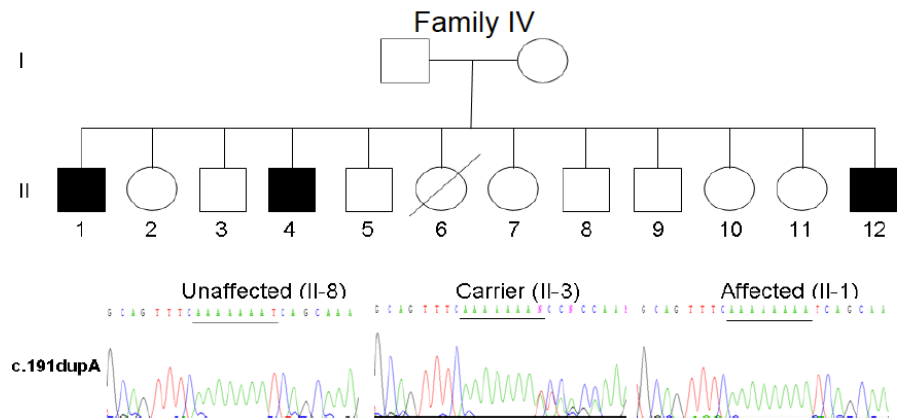
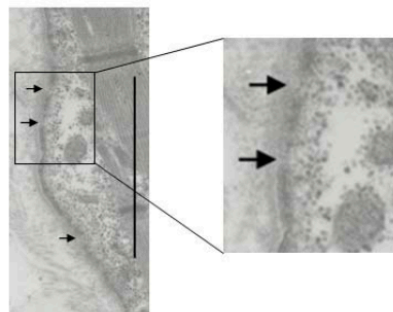
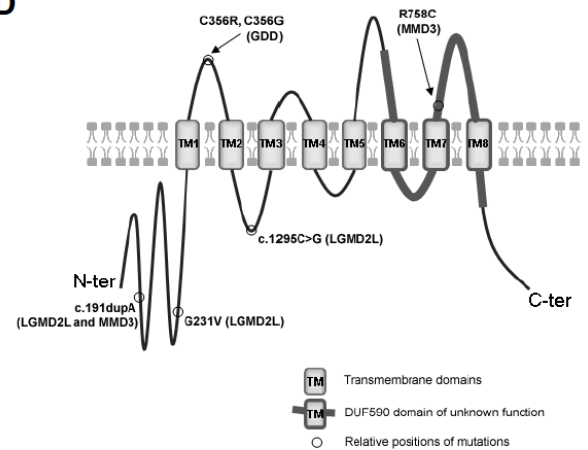
A**B****C****D**

Figure 3.2 Identification of *ANO5* mutations in non-dysferlin Miyoshi Myopathy families

(A) Genomic sequence chromatograms of exon 20 of *ANO5* show that in the non-dysferlin MM Finnish family H which is linked with defective membrane repair [136] there is a homozygous nucleotide substitution which would result in an amino acid substitution (c.2272C>T/R758C).

(B) In the MMD3 Dutch family IV the mutation identified is c.191dupA in exon 5 inherited as homozygous. The same mutation is present as heterozygous in the LGMD2L Family FC29.

(C) EM micrograph of patient II:6 muscle from Family H highlights multifocal loss of sarcolemmal membrane. Magnification x5000. Scale bar = 5 μ m.

(D) Predicted structure of human *ANO5* and the relative position of the GDD1, LGMD2L and MMD3 mutations. *ANO5* is predicted to contain eight transmembrane (TM) domains with both the N-terminal and the C-terminal regions located intracellularly. The DUF590 domain contains at last three TM domains (TM6-8). The MMD3 R758C mutation which is associated with defective membrane repair is located extracellularly as are the two GDD mutations. The LGMD2L mutations and one MMD3 mutation are located to intracellular regions.

(**Figure 3.2B**). Both variants were shown to segregate with the disease in the two families. None of the mutations have been reported as variants in the following databases: the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database of genetic variation (dbSNP build 130), the Human Genome Diversity Project in collaboration with the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (HGDP-CEPH) and the International HapMap Project (Merged phases 1, 2 & 3). Considering that the five *ANO5* families have diverse origins (three FC, one Dutch and one Finnish), we tested their carrier frequencies in these three populations, as well as in panels of United Kingdom (UK) Caucasian controls (from the Health Protection Agency of United Kingdom) and CEPH controls. The c.1295C>G variant was absent in 210 FC and 162 CEPH control chromosomes, and the c.692G>T (G231V) variant was absent in 210 FC control chromosomes. The c.2272C>T (R758C) variant was not detected in 100 UK, nor in 208 FC control chromosomes, but was detected in one out of 368 Finnish control chromosomes, indicating that this variant is present in the Finnish population at low frequency. The c.191dupA mutation was absent in 210 FC and in 152 CEPH control chromosomes, but was identified in one out of 100 UK and in two out of 210 Dutch control chromosomes. The observed absence or very low population frequencies of the *ANO5* mutations strongly support our conclusion that these cause LGMD2L and MMD3.

ANO5 is predicted to produce several alternatively spliced isoforms, with the major isoform in muscle retaining all 22 exons [137]. Based on the predicted full coding sequence (NCBI reference sequence NM_213599.2), it is expected that the mutations c.1295C>G (LGMD2L) and c.191dupA (LGMD2L and MMD3) lead to a frameshift and premature truncation (p.Ala432GlyfsX49 and p.Asn64LysfsX15, respectively, **Figure 3.2D**). As it is often the case with mRNAs containing premature termination codons, a translation-coupled nonsense-mediated RNA decay (NMD) mechanism may lead to their more rapid degradation [138]. To test if transcripts carrying the mutations c.1295C>G and c.191dupA are subject to NMD, lymphoblastoid cell lines isolated from EBV-transformed lymphocytes

were grown in IMDM medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% Fetal Bovine serum (Invitrogen) and incubated for nine hours with 0,1% DMSO (vehicle) or 100 µg/mL of cycloheximide (Sigma, Saint Louis, MS), a translation inhibitor. Quantitative RT-PCR were performed in triplicate on extracted RNA, and expression of *ANO5* was normalized to a set of three control genes (*GAPDH* [MIM 138400], *PUM1* [MIM 607204] and *RPL13A*) using QBase, a modified $\Delta\Delta C_t$ method [139], at the Génome Québec and Université de Sherbrooke RNomics Centre. All controls and cases demonstrated an increase in the relative *ANO5* expression as a consequence of cycloheximide treatment (**Figure 3.3A**); however, the differential *ANO5* expression between cycloheximide-treated and untreated cells was significantly greater in patients homozygous for c.1295C>G (n=2) versus controls (n=3, p<0.001, Student's *t*-test, **Figure 3.3B**), suggesting that the mutated transcripts were protected from NMD when translation was inhibited. The approximate 5-fold increase observed for case FC29-II:1 (**Figure 3.3A**), as compared to the 8- and 9-fold increases observed for the two c.1295C>G aberrant splicing mutation homozygote cases, is in agreement with her heterozygosis state for a premature termination (c.191dupA) and a missense (c.692G>T, G231V) mutations. These results strongly suggest that the two variants c.1295C>G and c.191dupA are associated with a loss of ANO5 function. Previously, dominant *ANO5* mutations have been reported in two families with gnathodiaphyseal dysplasia (GDD, [MIM 166260]), a rare skeletal syndrome characterized by bone fragility, cement-osseous lesions of the maxilla and mandible, and diaphyseal sclerosis of tubular bones [140]. In these patients no other abnormalities in non-skeletal tissues have been reported [140]. The missense mutations in GDD patients affect a conserved cysteine located in an extracellular loop of ANO5, similar to the R758C mutation found in MMD3 patients (**Figure 3.2D**). However, since GDD is a dominant disease, it was hypothesized that the mutations in these patients cause a gain-of-function effect predominantly in skeletal tissues [140]. The only two available polyclonal antibodies generated against N- and C-terminal epitopes of mouse Ano5 [141] failed to recognize the normal human protein on Western blots generated from transfected HeLa and Cos-1 cell

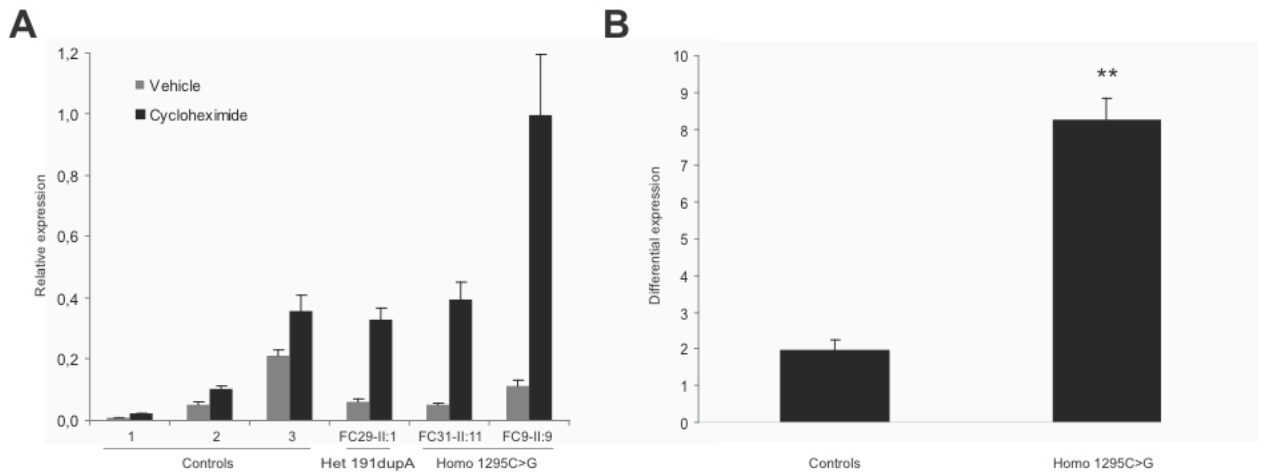


Figure 3.3 Analysis of *ANO5* expression following cycloheximide treatment in patients carrying mutations producing premature terminations

(A) *ANO5* relative expression in lymphoblastoid cell lines treated with 100ug/ml of the translation inhibitor cycloheximide for 9 h as compared to cells treated with vehicle (0,1% DMSO). A greater increase was observed for all three patients (9-, 8- and 5.5-fold) compared to controls (2-fold). Patients FC9-II:9 and FC31-II:11 are homozygous for c.1295C>G, causing an aberrant splicing in exon 13, a frameshift and a premature termination codon. Patient FC29-II:1 is heterozygote for c.191dupA, causing a frameshift and a premature stop codon, and for c.692G>T, predicting to result in a missense.

(B) The differential expression represents the *ANO5* expression ratio of cycloheximide-treated as compared to untreated cells. Cases homozygous for c.1295C>G (n=2) showed an 8-fold increase, which was significantly greater than the 2-fold differential increase observed in controls (n=3, p<0.001, Student's *t*-test)

lysates. By immunofluorescence non-specific perimembranous and cytoplasmic staining was detected in skeletal muscle (data not shown), thereby precluding the testing of the impact of the mutations on the expression and localization of ANO5 in patient muscle.

Table 3.1 summarizes the clinical findings for patients carrying *ANO5* mutations that are also presented in greater details in supplemental **Table 3.S1**. LGMD2L patients are characterized by late-onset proximal scapular and pelvic girdle muscle weakness (mean age 34.4, 20-55), accompanied by asymmetrical atrophy of the quadriceps femoris and biceps brachii [119]. Though calf hypertrophy can be observed at presentation, they may develop later in the course asymmetrical mild calf atrophy usually not associated with weakness. No distal weakness in the upper limbs was observed. None of the LGMD2L patients lost walking, though the proximal weakness led to difficulties climbing stairs. The intrafamilial variability is striking with two patients reporting no symptoms at ages 68 (FC9-II:3) and 61 (FC31-II:3), though mild iliopsoas weakness was documented on examination and the creatine kinases (CK) levels were known to be elevated in the past years for both cases (**Table 3.1**). The phenotype is quite different for MMD3 patients. The Dutch patients (family IV) showed early calf weakness, along with difficulties of walking on tiptoes, without atrophy [135, 136]. In the Finnish patients (family H), calf hypertrophy was seen in both cases during the early stages of their disease, but case H-II:6 later developed asymmetric calf atrophy. Despite the hypertrophy, calf weakness has always been an initial manifestation of all MMD3 cases. Asymmetric involvement of the proximal muscles of the lower and upper limb-girdles is a later manifestation with quadriceps atrophy being observed with time in two out of five MMD3 patients (**Table 3.1** and **Table 3.S1**). The FC case FC29-II:1, which shares the exon 5 c.191dupA mutation with the MMD3 Dutch Family IV, had a somewhat overlapping LGMD2L and MMD3 phenotype. At age 63, she had concomitant late-onset asymmetrical proximal upper limb (deltoid, biceps, triceps) and iliopsoas weakness and distal upper limb (wrist and finger extensors) and tibialis anterior

Tableau 3.1 Clinical data of patients carrying *ANO5* mutations

Table 1. Clinical Data of Patients Carrying ANO5 Mutations														
Phenotype	Fam-ID ^a	Ethnic Bckg	Sex	ANO5 Mutations (gDNA)	Age (2009)	Age of Onset	Distal Weakness Arm	Iliops. MRC	Quad. Atrophy	Quad. MRC	Calf Muscles	Distal Weakness Leg	Loss of Walking	Maximum CK (IU)
LGMD2L	FC9-II:3 ²¹	FC	F	c.1295C>G ^b	68	AS	none	4/5	+	5/5	none	none	no	1,649
LGMD2L	FC9-II:4 ²¹	FC	M	c.1295C>G ^b	67	40	none	4/5	+	4.5/5	mild atrophy	none	no	1,032
LGMD2L	FC9-II:5 ²¹	FC	M	c.1295C>G ^b	65	37	none	4/5	+	4/5	mild atrophy	none	no	1,156
LGMD2L	FC9-II:9 ²¹	FC	M	c.1295C>G ^b	47	20	none	4/5	+	5/5	mild atrophy	none	no	6,000
LGMD2L	FC31-II:11	FC	M	c.1295C>G ^b	43	20	none	4/5	+	5/5	atrophy	calf muscles 4/5	no	8,081
LGMD2L	FC31-II:3	FC	F	c.1295C>G ^b	61	AS	none	4.5/5	-	5/5	hypertrophy	none	no	4,061
LGMD2L	FC29-II:1	FC	F	c.191 dupA / c.692G>T	64	55	none	3.5/5	+	4.5/5	hypertrophy	tibialis ant.4/5	no	1,339
MMD3	H-II:6 ²⁴	Fin	M	c.2272C>T ^b	44	20	none	Sin 4/5	+	4/5/2/5	hypertrophy	calf muscles 2/5	no	15,860
MMD3	H-II:4 ²⁴	Fin	M	c.2272C>T ^b	50	25	none	5/5	-	5/5	hypertrophy	calf muscles 4/5	no	12,290
MMD3	IV-II:1 ²³	Du	M	c.191 dupA ^b	72	51	none	4/5	-	4/5	none	calf muscles 2/5	no	5,400
MMD3	IV-II:4 ²³	Du	M	c.191 dupA ^b	67	45	none	5/5	+	5/5	none	calf muscles 2/5	no	4,500
MMD3	IV-II:12 ²³	Du	M	c.191 dupA ^b	53	39	none	5/5	-	5/5	none	calf muscles 2/5	no	4,800
Means					37									5,514

Abbreviations: Ethnic bckg, ethnic background; FC, French Canadian; Fin, Finnish; Du, Dutch; AS, asymptomatic; Quad., quadriceps; Iliops., iliopectors; MRC, Medical Research Council muscle strength scale; Tibialis ant., Tibialis anterior

^a Families FC9, H and IV refer to original articles (see ^{21,23,24}).

^b Patients homozygous for the mutation.

weakness, while having asymmetrical normal strength gastrocnemius hypertrophy. CK were elevated in all patients (1032-15860IU, mean 5514IU). No cardiac abnormalities were detected on electrocardiomyogram (ECG), Holter ECG and echocardiography for the FC and the Dutch patients. Electron microscopy performed on muscle from the LGMD2L patient FC9-II:9 [119] and MMD3 patient H-II:6 (**Figure 3.2C**) both showed multifocal disruption of the sarcolemmal membrane but no subsarcolemmal vesicle accumulation, as has been reported in dysferlinopathies [40, 42]. Furthermore, in the MMD3 Family H, membrane repair capability was found to be defective in patient fibroblasts by testing membrane resealing ability using either multiphoton laser irradiation or glass-bead-mediated wounding in the presence of fluorescent dyes, while lysosomal and enlargeosomal exocytosis was shown to occur normally indicating that the conventional membrane repair pathways were not disrupted [136].

Until recently the function of the Anoctamins was unknown. The ten human ANO proteins share an eight transmembrane domain structure, which led to their earlier classification as the TransMEMbrane Protein 16 (TMEM16) family, and a DUF590 domain of unknown function [127, 142]. Three recent reports have demonstrated that ANO1 corresponds to the elusive calcium-activated chloride channel (CaCC) [129-131]. In one of these studies, Schroeder *et al.* demonstrated that *Ano1* coded for the CaCC responsible for polyspermia blockade in *Xenopus* oocytes [130]. Since then several other independent studies confirmed that ANO1 and ANO2 function as CaCC in mouse and in human [132-134, 143, 144]. ANO6, ANO8 and ANO9 were also confirmed to be chloride channels implicated in the control of cellular volume [134]. Because of the significant structural similarity between members of the Anoctamin family it is predicted that all these proteins, including ANO5, are likely to function as CaCC. The physiological roles attributed to CaCC ranging from epithelial transport of electrolytes, cell volume control, olfactory and photoreceptor transduction, cardiac membrane excitability, to smooth muscle contraction still remain unclear in many tissues [145]. Until now no CaCC conductance has been reported in the

plasma membrane of skeletal muscles but the high sarcolemmal chloride conductance owing to the voltage-dependant chloride channel (CLCN1 [MIM 118425]) may have precluded the electrophysiological observation of such activity [146]. Calcium-activated chloride channels have also been reported in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscles [147], but appeared to respond to much higher calcium concentrations than the one observed for ANO1 [131]. A chloride current has been observed following membrane wounding of sea urchin embryos [148], which raises the possibility that ANO5 may be responsible for a chloride current needed during membrane repair in human muscle. Several additional lines of evidence suggest that ANO5 may be important in the development and maintenance of skeletal muscle: *ANO5* during embryogenesis is first expressed in the somites, particularly in the myotomal cells, and then in the muscle progenitor cells [141]; it is mostly expressed in skeletal muscle tissue in adult mice [137], and in skeletal muscle and cardiac tissues in human [140]; its expression is increased in dystrophin deficient mdx mice muscle [141]; and lastly *ANO5* is up-regulated during myogenic differentiation of cultured cells (C2C12, Sol8, L6) [141]. The identification of recessive *ANO5* mutations in patients with muscular dystrophies associated with sarcolemmal membrane lesions on electron microscopy and defective membrane repair documented on one MMD3 family raises the possibility that ANO5 may play an important role in the dysferlin-dependent muscle membrane repair pathway. By biochemical fractionation ANO5 has been shown to be present at the membrane and in vesicles in L6 myotubes and mouse skeletal muscle [141]. Dysferlin shows a similar distribution in C2C12 myotubes and muscle tissue [106, 149]. Dysferlin was identified as the first protein component of the sarcolemmal repair machinery and is predicted to function as a fusogen in the formation of the patch membrane required for membrane resealing [110]. Other proteins mediating with dysferlin in muscle membrane repair have been identified and include Tripartite motif-containing 72 (TRIM72) [113], Annexins [MIM 151690, 151740] [103, 111], AHNAK [MIM 103390] [116], and Caveolin-3 [112, 150]. It could be hypothesized that ANO5 present in vesicular membranes may respond to the intracellular

calcium influx known to occur with membrane damage [151] by leading to a chloride influx in the vesicle that modifies its conformation so it is recruited to the damage site [110]. The observation that *ANO5* mutations, as in dysferlinopathy, can lead to both a proximal and a distal muscular dystrophy further suggests that anoctaminopathies may also cause skeletal muscle demise through defective membrane repair.

Acknowledgments

We are grateful to all the patients and their family for their participation in this study. Special thanks to Professor Louise F. Charron for her original referral. We thank Dr. Anna-Kaisa Anttonen (Dept of genetics, University of Helsinki, Finland) for extracting the DNA from the Finnish family, and Prof. Anna-Elina Lehesjoki (Folkhälsan Institute of Genetics, University of Helsinki, Finland) who carried mutation testing in controls. We thank Dr. Guy A. Rouleau for providing CEPH controls. We would also like to thank the Sequencing and Genotyping platforms of the McGill University/Génomique Québec Innovation Centre, and the Sequencing Facility at Durham University. Many thanks to the Génomique Québec and Université de Sherbrooke RNomics Centre who carried out the qPCR for the NMD assays, in particular Philippe Thibault. This study was supported by the Muscular Dystrophy Association of United States (MDA 4001 and MDA 131863), Muscular Dystrophy Campaign (UK) and the Jain Foundation. V.B. is a recipient of a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) scholarship.

Web Resources

AutoSNPa <http://dna.leeds.ac.uk/autosnpa/>

Centre d'Étude du Polymorphisme Humain <http://www.cephb.fr/>

Génome Québec and Université de Sherbrooke RNomics Centre <http://lgfus.ca>

Health Protection Agency of United Kingdom <http://www.hpacultures.org.uk/>

Human Genome Diversity Project in collaboration with the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (HGDP-CEPH) <http://hgdp.uchicago.edu/>

Human Splicing Finder <http://www.umd.be/HSF/HSF.html>

The International HapMap project <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>

McGill University and Genome Québec Innovation Centre
<http://www.genomequebecplatforms.com/mcgill/home/index.aspx>

Multiz <http://genome.ucsc.edu>

National Centre for Biotechnology information (NCBI) database of genetic variation (dbSNP) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NetGene2 server <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

Tableau 3.S1 MRI and MRC muscular weakness observed in *ANO5* patients (1/2)

Supplemental Table S1. MRI and MRC muscular weakness observed in <i>ANO5</i> patients (Part 1 of 2)									
Individual ID	FC9-I-9	FC9-I-4	FC9-II:3	FC31-II:11	FC31-II:3	FC29-II:1	Sex	Phenotype	
	M	M	F	M	F	F			
	LGMD2L	LGMD2L	LGMD2L	LGMD2L	LGMD2L	LGMD2L			
Ethnic background	French-Canadian	French-Canadian	French-Canadian	French-Canadian	French-Canadian	French-Canadian			
<i>ANO5</i> mutations	c.1295C>G	c.1295C>G	c.1295C>G	c.1295C>G	c.1295C>G	c.191dupA/c.692G>T			
Age of onset	20	40	AS	20	AS	55			
Symptoms at onset			AS	Proximal leg weakness	AS				
Age at examination	20	63	68	42	61	63			
Type of examination	MRC	MRC	MRC	MRC	MRC	MRC			
Facial muscles	5	5	5	5	5	5			
Neck Flexors	5	5	5	5	5	5			
Neck extensor	5	5	5	5	5	5			
Deltoid	5	4.5	5	5	5	4.5			
Biceps brachii	5	5	4	4	5	4			
Triceps	5	5	5	5	5	5			
Distal weakness arm	5	5	5	5	5	5			
Wrist extensors	5	5	5	5	5	4.5			
Finger extensors	5	5	5	5	5	5			
Grip muscles	5	5	5	5	5	5			
Iliopsoas	5	4+	4	4	4.5	3.5			
Quadriceps	5	5	5	4	5	4.5			
Gluteus	5	5	5	4	5	5			
Adductor Femoris	5	5	5	4	5	5			
Hamstrings	5	5	5	5	5	5			
Tibialis anterior	5	5	5	5	5	3			
Gastrocs	5	5	5	4	5	5			
Loss of walking	No	No	No	No	No	No			
Maximum CK (IU)	1,200	3,780-6,000	1,449	8,081	4,061	1,339			

Abbreviations: MRC, Medical Research Council strength measurement (on a scale of 5); MRI, Magnetic Resonance Imaging; CT, Computer Tomography; AS, asymptomatic; L, left; R, right; H, hypertrophy; CMUS, calf muscle unpleasant sensations; Vast., vastus; Med., medialis; Intermed., intermedialis; Lat., lateralis; Gluteus Min., gluteus minimus; NA, Non-available data.

Tableau 3.S1 MRI and MRC muscular weakness observed in *ANO5* patients (2/2)

Supplemental Table S1. MRI and MRC muscular weakness observed in <i>ANO5</i> patients (Part 2 of 2)									
Individual ID	H-II:6		H-II:4		IV-II:1	IV-II:4		IV-II:12	
Sex	M		M		M	M		M	
Phenotype	MMD3		MMD3		MMD3	MMD3		MMD3	
Ethnic background	Finnish		Finnish		Dutch	Dutch		Dutch	
<i>ANO5</i> mutations	c.2272C>T		c.2272C>T		c.191dupA	c.191dupA		c.191dupA	
Age of onset	25		20		51	45		39	
Symptoms at onset	CMUS		CMUS		R-sided inability to stand on tiptoe	L-sided inability to stand on tiptoe		L-sided inability to stand on tiptoe	
Age at examination	25		20		57	53		44	
Type of examination	MRI/MRC		MRI/MRC		CT/MRC	MRC		MRC	
Facial muscles	NA		NA		NA	NA		NA	
Neck flexors	NA		NA		NA	NA		NA	
Neck extensor	NA		NA		NA	NA		NA	
Deltoid	NA		NA		NA	NA		NA	
Biceps brachii	NA		NA		NA	NA		NA	
Triceps	NA		NA		NA	NA		NA	
Distal weakness arm	NA		NA		NA	NA		NA	
Wrist extensors	NA		NA		NA	NA		NA	
Finger extensors	NA		NA		NA	NA		NA	
Grip muscles	NA		NA		NA	NA		NA	
Iliopsoas	NA		NA		R4/L5	NA		NA	
Quadriceps	NA		NA		bilateral vast. med., interned., lat.+++ / 5	R 4 L5		NA	
Gluteus	NA		NA		gluteus min. +++ / 5	NA		NA	
Adductor Femoris	NA		NA		+++ / 5	NA		NA	
Hamstrings	NA		NA		+++ / 5	NA		NA	
Tibialis anterior	NA		NA		5	NA		NA	
Gastrocs	++ / 5 H		++ / 4 H		R Gastroc / So +++ / 2 L Gastroc +++ So ++ / 3	Both 4		L3 / R4	
Loss of walking	No		No		No	No		No	
Maximum CK (IU)	12,290		2,589-10,471		5,400	4,500		4,800	

Abbreviations: MRC, Medical Research Council strength measurement (on a scale of 5); MRI, Magnetic Resonance Imaging; CT, Computer Tomography; AS, asymptomatic; L, left; R, right; H, hypertrophy; CMUS, calf muscle unpleasant sensations; Vast., vastus; Med., medialis; Interned., intermedialis; Lat., lateralis; Gluteus Min., gluteus minimus; NA, Non-available data.

3.3 LGMD2L, une forme commune parmi les dystrophies musculaires des ceintures

Notre découverte des premières mutations *Anoctamine 5* associées à un phénotype musculaire a soulevé beaucoup d'enthousiasme et d'intérêt dans notre laboratoire, mais aussi dans la communauté scientifique intéressée aux désordres du muscle. Cet enthousiasme est né de la description subséquente par plusieurs centres neuromusculaires européens et américains d'un nombre considérable de cas *ANO5* et du présage que les anoctaminopathies 5, qui incluent LGMD2L et MMD3, représenteront une fraction significative des LGMD chez l'adulte.

Une étude britannique publiée en 2011 a, la première, relevé l'importance relative qu'occupe la LGMD2L au sein du groupe des LGMD [152]. En interrogeant une banque de 65 patients LGMD (59 familles) de type indéterminé avec CK élevés, 20 d'entre eux (15 familles, 25%) ont été expliqués par des mutations au gène *ANO5*. Cette étude a par ailleurs mis en évidence un effet fondateur pour la mutation c.191dupA dans le nord du Royaume-Uni et a estimé la prévalence de la LGMD2L à 0.26/100 000 [152], ce qui la classerait troisième derrière la LGMD2A (0.6/100 000) et la LGMD2I (0.43/100 000) dans ce bassin géographique [50]. La LGMD2L serait deux fois plus fréquente que la LGMD2B (Dysferline) [152].

À ce jour, 15 mutations *ANO5* se sont ajoutées aux quatre que nous avons publiées initialement; elles ont été publiées [152-154], présentées dans des résumés de congrès [155, 156] ou déposées dans la base de données de variations génétiques Leiden (Leiden Open Variation Database, LOVD, (<http://LOVD.nl/ANO5>)). Ce total de 19 mutations associées à un phénotype musculaire (**Figure 3.4**) exclut toutefois les mutations non décrites dans les résumés de congrès, mais présentées au cours de ces derniers. Ces mutations sont de toutes les natures (10 faux-sens, 2 non-sens, 3 sites d'épissage, 4 duplications/insertions/délétions)

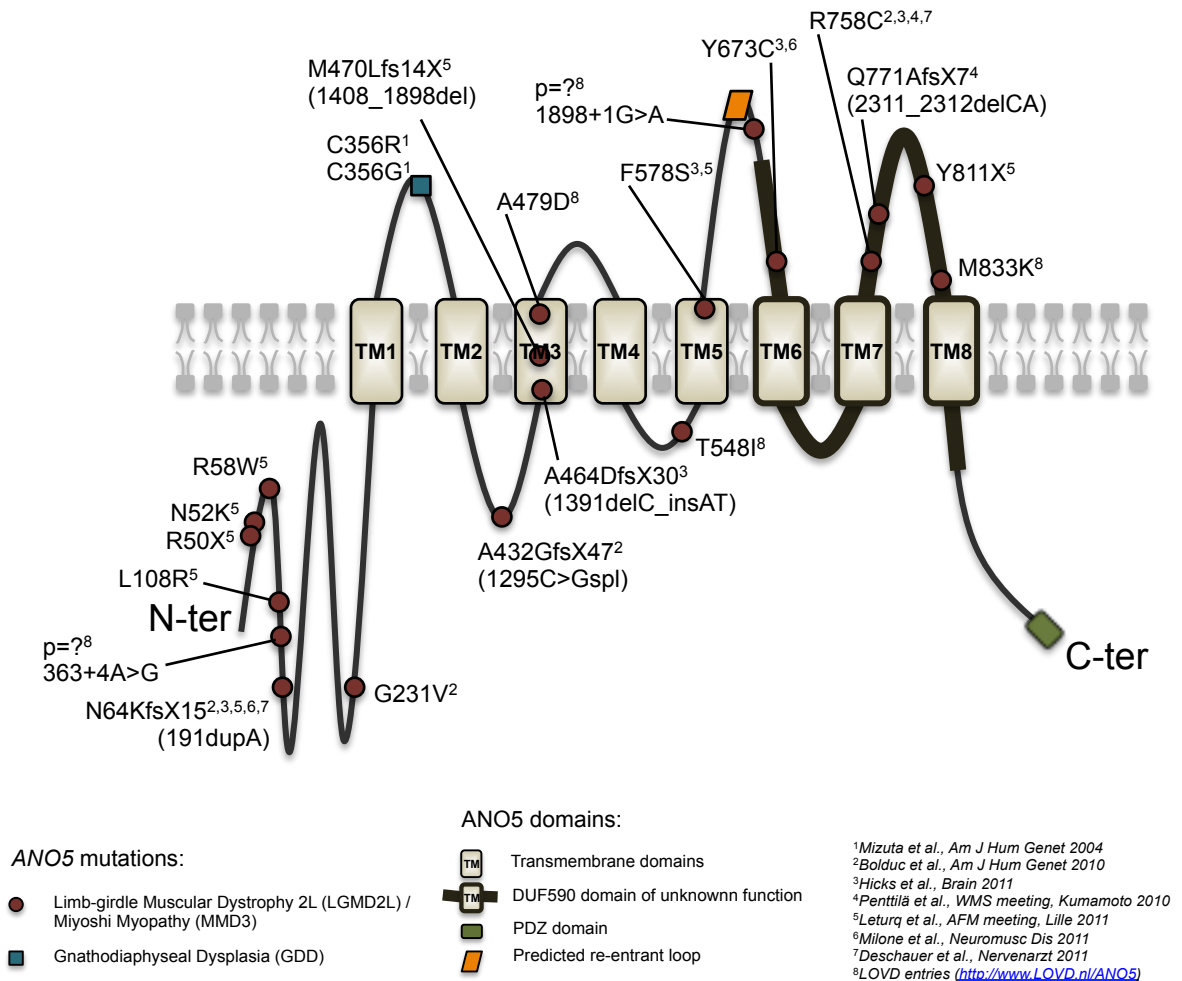


Figure 3.4 Représentation schématique de la protéine ANO5 et des mutations associées à un phénotype de dystrophie musculaire

La protéine ANO5 a une structure prédite de huit domaines transmembranaires (TM1-TM8), d'un domaine à fonction inconnue DUF590 et d'un domaine PDZ en extrémité C-terminale. Une boucle réentrante est prédite entre les TM5 et TM6. Les deux mutations associées à un phénotype de dysplasie gnathodiaphyseale (GDD) affectent le même résidu en position 356 et sont représentées par un carré. Les 19 mutations associées à une dystrophie musculaire (LGMD2L et MMD3) sont réparties dans plusieurs domaines de la protéine et sont représentées par des cercles.

et sont réparties ainsi : 7 dans la portion N-terminale, 4 dans des domaines transmembranaires, 5 dans des boucles extracellulaires faisant partie du domaine à fonction inconnue DUF590, 1 dans une boucle extracellulaire, 2 dans des boucles intracellulaires, et aucune dans la portion C-terminale. La mutation 191dupA est la plus fréquente. Les cas *ANO5* rapportés à ce jour sont de diverses origines ethniques, notamment de la Finlande, de la Grande-Bretagne, de l'Allemagne, des Pays-Bas, de l'Espagne, de la Belgique, de la France, du Canada et des États-Unis [152, 154-157].

Moins de deux ans après notre publication, nous pouvons d'ores et déjà apprécier l'importance de la découverte des premières mutations au gène *ANO5*. L'ajout de la détection de mutations *ANO5* à l'algorithme de diagnostic des LGMD permettra de résoudre le cas de sujets toujours sans diagnostic moléculaire et d'améliorer le diagnostic des nouveaux sujets qui se présentent en clinique.

3.4 Recherche de mutations *ANO5* dans une cohorte canadienne-française de LGMD récessive

Nous avons assemblé une cohorte de 38 familles canadiennes-françaises (57 patients) atteintes de LGMD récessive de type indéterminé et avons recueilli au laboratoire un total de 196 échantillons qui incluent également les échantillons des parents et des fratries (**Tableau 3.2**). Les patients ont été recrutés sur la base d'un diagnostic de dystrophie musculaire des ceintures récessive de type indéterminé, avec ou sans atrophie du quadriceps. Des données sur l'histoire familiale, l'âge d'apparition des symptômes, l'examen de forces musculaires et les niveaux sériques de créatine kinase (CK) ont été comptabilisés. Le cas échéant, la révision du rapport de pathologie d'une biopsie musculaire précédente a été effectuée.

Tableau 3.2 Dépistage de mutations et données cliniques sommaires sur une cohorte canadienne-française de LGMD récessive

Famille ID	# individus Recrutés	# individus Atteints	Locus Candidat au Chr11p14.3-p15.1						Proband				
			Mutations <i>Dysferlin</i>	Mutation <i>DOK7</i> (dupTGCC)	Liaison	LOD Score Maximum	Mutations <i>ANOS</i> ^b	Diagnostic	Sexe	Début Symptômes (Décennie)	Maximum CK (U/L)	Atrophie Quadriceps	Origine Parents
FC9	7	4	n/d	Non		2.7	1295C>G / 1295C>G	ANOS	M	20aine	6 000	Oui	Outaouais
FC29	2	1	Non	Non		n/d	191dupA / G231V	ANOS	F	50aine	1 339	Oui	Cap.-Nationale
FC31	5	2	n/d	n/d		n/d	1295C>G / 1295C>G	ANOS	M	20aine	8 081	Oui	Toronto
FC35	2	1	n/d	n/d		n/d	T714S / ?	ANOS?	F	40aine	288	Oui	Montréal
FC15	8	2	Non	Non		1.1	Non		M	60aine	439	Oui	Centre-du-Québec
FC8	5	2	Non	Non		0.73	Non		M	30aine	264	Oui	Montréal
FC6	6	1	n/d	Non		0.375	Non		M	20aine	1 851	Oui	Mauricie/Gaspésie
FC7	7	1	Non	Non		0.33	Non		M	10aine	202	Oui	Lanaudière/Cap.-Nationale
FC1	4	1	n/d	Non		0.125	Non		M	10aine	394	Oui	SLSJ
FC25	4	1	n/d	Non		0.25	Non		M	Adoles	345	Oui	Montréal
FC26	7	2	n/d	n/d		0.25	Non		F	40aine	700	Non	Montréal/Montréal
FC11	4	1	n/d	Non		0.025	Non		F	10aine	258	Oui	Outaouais
FC37	1	1	n/d	Non	positive / indéterminée	n/d	Non		F	n/d	n/d	n/d	Cap.-Nationale
FC39	1	1	n/d	Non		n/d	Non		M	30aine	4000	Non	SLSJ
FC32	6	1	n/d	n/d		n/d	Non		M	20aine	n/d	Oui	Laurentides
FC23	1	1	n/d	Non		n/d	Non (Incomp.)		M	Enfance	n/d	Oui	SLSJ/Acadie
FC30	3	3	n/d	n/d		n/d	Non (Incomp.)		F	n/d	n/d	n/d	Ontario
FC34	4	2	n/d	n/d		n/d	Non (Incomp.)		F	20aine	élevés	Oui	Outaouais
FC40	1	1	Non	n/d		n/d	Non (Incomp.)		M	30aine	897	Oui	Gaspésie
IT33	4	1	Non	n/d		n/d	Non		M	40aine	n/d	Non	Italie
FH12	5	2	n/d	n/d		n/d	Non		F	20aine	744	Oui	Haïti
FC5	6	1	Incertain ^a	Non		0.375	Non	Dysferlin?	F	30aine	48	Oui	Cap.-Nationale
FC2	2	1	Incertain ^a	Non		0.125	Non	Dysferlin?	M	Enfance	2 500	Non	Outaouais/Montréal
FC38	1	1	Incertain ^a	n/d		n/d	Non	Dysferlin?	F	Enfance	411	Oui	Cap.-Nationale
FC36	8	3	n/d	n/d		n/d	n/d		F	n/d	n/d	n/d	n/d
FC4	8	1	Non	Non		Neg	Non		M	Enfance	751	Oui	Mauricie/Montréal
FC16	4	1	Non	Non		Neg	Non		F	40aine	2 681	Oui	Montréal
FC24	5	2	Non	Non		Neg	Non		F	20aine	n/d	n/d	Cap.-Nationale
FC3	6	1	n/d	Non		Neg	Non		F	Enfance	899	Oui	Montréal
FC10	5	1	n/d	Non	négative	Neg	Non		F	20aine	77	Oui	Gaspésie
FC22	5	1	n/d	n/d		Neg	Non		F	40aine	45	Non	Montréal
FC13	13	2	Non	Incertain ^a		Neg	Non	DOK7?	M	20aine	2 499	Oui	SLSJ
FC17	6	1	Incertain ^a	Non		Neg	Non	Dysferlin?	M	20aine	1 000	Oui	SLSJ
FC28	10	1	Incertain ^a	n/d		Neg	Non	Dysferlin?	F	40aine	7500	Oui	Montréal/Centre-du-Québec
FC18	7	2	Oui	n/d		n/d	n/d	Dysferlin	F	20aine	10 734	Oui	
FC19	4	1	n/d	Oui	exclue	n/d	n/d	DOK7	M			Oui	
FC20	9	1	Oui	n/d		n/d	n/d	Dysferlin	F	20aine	7 520	Oui	
FC21	10	4	Oui	n/d		n/d	n/d	Dysferlin	F				
38	196	57	Totaux										

Abbreviations: FC, Canadien Français (French-Canadian); FH, Franco-Haitien; IT, Italien; n/d, Donnée Non-Disponible; Neg, Négatif; Cap.-Nationale, Capitale-Nationale; SLSJ, Saguenay-Lac-St-Jean.

^a Présence d'une seule mutation et/ou pathogénécité inconnue pour la(les) mutation(s).

^b Séquençage des 22 exons *ANOS*. Le séquençage est indiqué comme incomplet (Incomp.) si les réactions ont échoué pour plus de deux exons.

Nos efforts pour vérifier la séquence codante (22 exons et jonctions intron-exon) d'*ANO5* chez un patient par famille n'ont pour l'instant identifié des mutations que dans les trois familles incluses dans la publication [157] et n'ont pas conclu à la présence de mutations additionnelles dans la cohorte. Nous avons de plus séquencé l'ADN complémentaire isolé de cellules lymphocytes pour 10 patients, de même que la séquence génomique entière d'*ANO5* (UTRs, exons et introns – environ 90kb) chez trois patients, dont l'individu FC8-II 4 (données non-montrées). La comparaison des haplotypes de l'intervalle ne suggère pas non plus la présence d'une mutation commune dans notre population (données non-montrées). À ce stade, nous ne pouvons conclure sur le statut des familles sans diagnostic. Les méthodes que nous avons employées pour dépister des mutations *ANO5* (séquençage des exons, de l'ADNc et de la région génomique) ne permettent pas de détecter des grandes variations structurelles, telles de larges duplications, délétions ou insertions. Un nombre croissant de mutations de cette nature est aujourd'hui associé à des maladies mendéliennes [158]. Nous ne pouvons exclure non plus la présence de mutations dans des régions régulatrices, en amont ou en aval de la séquence du gène. L'accès à des échantillons musculaires de qualité serait requis pour tester les niveaux d'expression d'*ANO5* chez ces patients. La disponibilité d'un anticorps validé serait aussi davantage utile pour cribler par immunoblot les patients qui présentent une déficience ou des anomalies en *ANO5*.

Dans leur étude, Hicks *et al.* ont interrogé une banque de 64 patients (59 familles) sélectionnés selon trois critères, soit une présentation de dystrophie musculaire des ceintures de type indéterminé, un début des symptômes tardif et une élévation des taux sériques de CKs. De ce nombre, 20 patients (15 familles) étaient porteurs de mutations au gène *ANO5*, résultant un taux de détection de 25% des familles (15/59) [152]. Ce résultat contraste avec la faible proportion de notre cohorte canadienne-française qui est expliquée par des mutations au gène *ANO5* (3/34 familles, 8.8%, **Tableau 3.2**). Considérant que notre population canadienne-française soit issue de l'émigration européenne, particulièrement française [159], il demeure étonnant de ne pas avoir détecté plus de cas *ANO5* parmi notre

cohorte. En particulier, l'identification de la mutation c.191dupA chez une seule patiente canadienne-française (FC29-II :1), alors qu'il s'agit de la mutation la plus fréquente décrite à ce jour en Europe, laisse croire que cette mutation pourrait avoir été introduite plus récemment dans notre population, ce qui expliquerait l'absence d'un nombre de cas importants suggestifs d'un effet fondateur. Nous ne savons pas pour l'instant si cette patiente partage un haplotype avec des patients européens, notamment de la France. La mutation d'épissage c.1295C>G n'a pour l'instant été décrite que chez deux familles canadiennes-françaises. Elle pourrait avoir émergé ici et avoir un effet fondateur dans l'ouest du Québec, nos deux familles (FC9 et FC31) ayant des origines géographiques rapprochées (Outaouais et Ontario-francophone).

La différence première entre l'étude de Hicks *et al.* et la nôtre vient du fait que les familles de notre cohorte ont été assemblées sur la base d'un diagnostic de LGMD indéterminé, avec ou sans atrophie du quadriceps. Il est certain que notre cohorte canadienne-française est hétérogène. C'est d'ailleurs dans ce contexte et en sachant que 1- des similitudes existent entre les LGMD2L et 2B (Dysferline) et que 2- une mutation à effet fondateur au gène *DOK7* (dupTGCC) qui résulte en une apparente dystrophie des ceintures a un taux de porteurs élevé dans la population canadienne-française [121], que nous avons dû exclure quatre familles suite au dépistage de mutations aux gènes *Dysferline* et *DOK7* dans notre cohorte (**Tableau 3.2**). Il n'en demeure pas moins qu'il existe une variabilité phénotypique parmi les familles toujours incluses dans notre cohorte, ne serait-ce que quant à l'âge d'apparition des premiers symptômes et le degré d'élévation des taux de CK. Tout suggère donc qu'il reste encore des gènes mutés à identifier dans ces cas. Pour ce qui est des familles qui semblaient liées au locus du chromosome 11, le peu d'informativité des marqueurs microsatellites génotypés et la petite taille des familles ont probablement contribué à nous induire en erreur.

CHAPITRE 4 - Un épissage alternatif préserverait la localisation d'ANO5 chez un patient LGMD2L

4.1 Contribution des co-auteurs

V.B. a produit une partie des immunofluorescences, l'expérience de clonage des fragments RT-PCR et la première version du manuscrit.

T.C.C. a produit les immunoblots, une partie des immunofluorescences et a révisé le manuscrit.

R.L. a contribué à la mise au point des expériences d'immunofluorescence et d'immunoblot et a révisé le manuscrit.

B.B. a supervisé le projet et révisé le manuscrit.

4.2 Manuscrit en préparation

Un épissage alternatif préserverait la localisation d'ANO5 chez un patient LGMD2L

Véronique Bolduc*, Talita C. Conte*, Roxanne Larivière, Bernard Brais[§]

Laboratoire de neurogénétique de la motricité, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec H2L 4M1, Canada.

*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente à ce travail.

[§]Contact: Bernard Brais, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, Pavillon Mailloux, Porte M4211-L, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1. Tel. 1-514-890-8000 (ext. 25560), Fax: 1-514-412-752

Introduction

En 2010, nous avons publié la première description de mutations récessives au gène *Anoctamine 5* (*ANO5*) responsables d'une nouvelle forme de dystrophie musculaire des ceintures avec une importante atteinte du quadriceps (LGMD2L) et d'une myopathie de Miyoshi sans déficience en Dysferline (MMD3) (**Chapitre 3**, [157]). L'identification par la suite de cas LGMD2L additionnels a laissé présager que les mutations au gène *ANO5* expliqueront une proportion non-négligeable de patients avec dystrophie des ceintures [152].

ANO5 a été identifiée en 2004 pour être mutée dans une forme rare de dysplasie gnathodiaphyseale dominante, GDD (MIM 166260) [140]. Deux mutations distinctes, affectant le même résidu dans la première boucle extracellulaire, ont été rapportées chez autant de familles. Les patients étaient caractérisés par une fragilité osseuse, des lésions osseuses au niveau de la mâchoire où des masses calcifiées étaient parfois accompagnées de difformités, et une densification de la diaphyse des longs os. Les auteurs de cette étude ont poursuivi la caractérisation d'*ANO5* et les résultats de leurs travaux corroborent l'idée qu'*ANO5* soit importante pour la biologie du muscle. Il a été montré que (1) l'isoforme d'ARN messager *ANO5* majoritaire dans le muscle comprenait les 22 exons et codait pour une protéine de 913 acides aminés (107 kDa) [137, 140]; (2) *ANO5* produisait de nombreux variants d'épissage de façon tissu-dépendante [137]; (3) un domaine PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) responsable de médier des interactions protéine-protéine était contenu dans l'extrémité C-terminale d'*ANO5* [132, 160]; (4) l'expression d'*ANO5* était la plus élevée dans les muscles squelettiques et cardiaque chez l'humain [140], et dans les tissus musculaires squelettiques et osseux chez la souris [137]; (5) l'expression d'*ANO5* était accrue dans les cellules myoblastes soumises à la différenciation myogénique [141]; (6) durant l'embryogenèse, *ANO5* était détectée dans le myotome, précurseur du tissu musculaire

[141]; et (7) par fractionnement des membranes du muscle squelettique, ANO5 ségrégait avec les vésicules intracellulaires [141].

Initialement désigné GDD1, ANO5 (TMEM16E) a été reconnue comme un membre de la famille de protéines des TransMEMbrane protein 16 (TMEM16) [161, 162] en raison de son homologie avec ce groupe de protéines qui possèdent une structure prédite comprenant huit domaines transmembranaires (TM), les extrémités N- et C-terminales exposées à la lumière du cytoplasme et un domaine à fonction inconnue (DUF590, InterPro IPR007632). Les mammifères comptent 10 paralogues (ANO1 à ANO10 chez l'humain), tous exprimés dans une variété de tissus et d'organes [142, 163]. La nomenclature de cette famille conservée de protéines, retrouvée chez tous les eucaryotes, a récemment été révisée à Anoctamine (ANO, pour canal ANionique à 8 (OCTA) domaines transmembranaires) pour faire suite à trois publications sur la fonction du premier membre de la famille, ANO1 [129-131]. Il est maintenant établi qu'ANO1 et ANO2 fonctionnent comme des canaux chloriques activés par le calcium (CaCC) dans divers systèmes physiologiques, tels dans les épithéliums des systèmes respiratoire et digestif [134, 143], le muscle lisse vasculaire [164], de même que pour l'excitation des membranes ciliales olfactives [133] et des terminaux photorécepteurs [132]. D'autres Anoctamines, dont ANO6 et ANO7, peuvent évoquer une conductance CaCC lorsqu'exprimées de façon exogène dans un système d'expression [163]. Néanmoins, il n'est pas encore établi si toutes les Anoctamines sont des canaux chlores activés par le calcium, notamment ANO5. En outre, ANO6 a également été montrée comme une « scramblase », responsable d'exposer les phospholipides tels la phosphatidylserine à la surface des cellules d'une lignée lymphocytaire de façon calcium-dépendante [165].

Plusieurs des gènes mutés responsables de diverses formes de LGMD encodent aussi des protéines transmembranaires importantes pour la structure, l'intégrité et la réparation du sarcolemme (notamment *Dysferline*, *Cavéoline-3*, α -, β -, δ -, et γ -*Sarcoglycane*) [166].

Cependant, la fonction d'ANO5 dans le muscle est inconnue. Pour caractériser le rôle d'ANO5 dans le muscle, et éventuellement comprendre comment une dysfonction d'ANO5 progresse en une dystrophie musculaire, nous avons tenté d'établir sa localisation subcellulaire, par immunofluorescence sur des cellules transfectées et sur des sections de tissus humains, puis par co-immunofluorescence sur des sections de tissus murins, en utilisant trois anticorps polyclonaux. Nos résultats suggèrent qu'ANO5 se localise à une structure qui suit la ligne Z des muscles striés et que cette localisation est conservée chez un patient homozygote pour une mutation qui provoque la dégradation des transcrits médiée par une troncation prématurée (nonsense-mediated RNA decay, NMD). L'épissage alternatif d'un exon subséquent permet de rétablir le cadre de lecture pour une proportion des transcrits porteurs de la mutation et pourrait être responsable de la préservation du marquage chez ce patient.

Méthodes

Anticorps, cellules et cDNA

Les lignées cellulaires Cos-1, Hela et HEK ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% FBS, sans antibiotiques. Les transfections ont été effectuées à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) lorsque la confluence cellulaire avait atteint 95%, en suivant les spécifications du fabricant. Les cellules étaient incubées pour 48 h en présence du lipofectant avant la récolte ou la fixation.

Deux anticorps polyclonaux α -ANO5 ont été acquis : Covalab (pab0597, Covalab, Villeurbanne, France) et Abgent (AP8580b, Abgent, San Diego, CA). L'anticorps hGDD1(C) dirigé contre un épitope C-terminal d'ANO5 a été fourni gracieusement par le laboratoire de Mitsuo Itakura (University of Tokushima, Tokushima, Japon). Les anticorps suivants ont été acquis: mouse anti-V5 (Invitrogen), mouse Tetra-His (Qiagen, Hilden, Allemagne), SERCA1 (MA3-912, Thermo Scientific, Waltham, MA), RyR (MA3-925, Thermo Scientific), DHPR (MA3-920, Thermo Scientific), OPA1 (612606, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), Nebulin (clone NB2, GeneTex, Irvine, CA), Dysferline (NCL-Hamlet, Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK), CAV3 (ab2912, Abcam, Cambridge, MA), β -Actin (ab49846, Abcam), Actin (MAB1501, Chemicon International, Millipore, Billerica, MA). Les anticorps secondaires pour les immunofluorescences ont été acquis chez Invitrogen: goat Anti-rabbit-488, goat Anti-mouse-488, goat Anti-mouse-555, Avidin-488, goat Anti-mouse (IgG1)-647, ou chez Vector Laboratories (Burlingame, CA) : Anti-rabbit biotinylé.

Les constructions ANO5-V5-His et LacZ-V5-His ont été généreusement fournies par le laboratoire du Dr. Itakura (University of Tokushima, Tokushima, Japon), et les constructions ANO1-His, ANO5-His, ANO6-His et ANO8-His par le laboratoire du Dr. Kunzelmann (University of Regensburg, Regensburg, Allemagne). La construction ANO5

sans étiquette (ANO5wt) a été produite en procédant à la mutagenèse de la construction ANO5-V5-His pour y ré-introduire le codon stop en utilisant le kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Biopsies

Le consentement écrit de chaque sujet a été obtenu avant de procéder à la biopsie. Le formulaire de consentement a reçu l'approbation du comité d'éthique de la recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Les biopsies à l'aiguille ont été réalisées à l'Institut thoracique de Montréal et les tissus de ces biopsies ont été traités à notre laboratoire. Une fraction de la biopsie était congelée rapidement dans l'azote liquide (« snap-freeze ») pour extraction d'ARN et de protéines. Les biopsies ouvertes ont été réalisées à l'Institut neurologique de Montréal (MNI). Les tissus ont été traités au Laboratoire de neuropathologie du MNI pour montage sur blocs, « snap-freeze » et extraction de protéines. Pour les sections de tissus, les blocs étaient coupés à 5 µm, puis congelés à -20°C et envoyés à notre laboratoire. Au moment de décongeler, les tissus étaient fixés au PFA 4% (FD NeuroTechnologies, Baltimore, MD) pour 15 min, puis rincés au TBS. Les biopsies des muscles omohyoïdiens ont été effectuées au CHUM et les tissus manipulés dans notre laboratoire tel que décrit plus haut. L'extraction d'ARN à partir des échantillons de muscle et de cellules lymphocytes a été effectuée telle que décrite au chapitre 2.2.

Tous les protocoles de manipulation de souris ont reçu l'approbation du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) du CHUM. Pour l'extraction de protéines, les muscles ont été prélevés, puis congelés rapidement dans l'azote liquide (« snap-freeze »). Au moment de l'extraction des protéines, le muscle a été broyé dans l'azote liquide, puis déposé dans le tampon d'extraction. Pour les coupes transversales, le muscle était prélevé, monté sur bloc, puis congelé pour 10 sec dans l'isopentane refroidie à l'azote liquide. Après les coupes (10 µm) au cryostat (CM3050 S, Leica microsystems, Wetzlar,

Allemagne), le tissu était fixé pour 15 min avec la PFA 4%, rincé au TBS, puis conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Pour les coupes longitudinales, la souris était perfusée au PFA 4%, puis les tissus prélevés et incubés pour 2 h dans la PFA 4% avant d'être transférés dans une solution de sucrose (30%) et conservés à 4°C. Pour le montage du bloc, le tissu était déposé dans un moule contenant de l'OCT compound (Sakura Finetechmical, Tokyo, Japon), puis congelé sur glace sèche et coupé au cryostat tel que décrit plus haut.

Immunoblots

Les extraits cellulaires totaux ont été extraits en récoltant les cellules directement dans un tampon urée (30 mM Tris HCl pH 6.8, 1% SDS, 4 M urée, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche, Mannaheim, Allemagne) et en soniquant les échantillons 2 fois 5 sec à puissance 4 (Sonifier Analog S-450A, Branson Ultrasonics, Danbury, CT). Pour les tissus de souris, les muscles ont été broyés dans l'azote liquide et resuspendus dans le tampon urée, puis soniqués. Un tampon de charge (40 mM Tris, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0,001% bleu bromophénol et 10% glycérol) était ajouté à l'extrait protéique avant la dénaturation qui a été effectuée à 37°C pour 15 min. Les tissus humains ont été homogénéisés pour 30 sec à vitesse maximale en utilisant l'homogénéisateur Ultra-Turrax T8 (Ika, Staufen, Allemagne) dans un tampon contenant 15% SDS, 20% glycérol, 75 mM Tris HCl pH 6.8, 5% β -mercaptoethanol, 0,001% bleu bromophénol. Les échantillons étaient ensuite dénaturés à 95°C pour 5 min, puis centrifugés pour 10 min. Le surnageant était conservé et quantifié, puis dilué dans le tampon de charge et dénaturé. Les échantillons ont été migrés sur un gel Tris-glycine à 7,5% d'acrylamide. Le transfert sur membrane PVDF ou nitrocellulose a été fait pour 2 h à 110 V dans un tampon contenant 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol et 0,1% SDS. Pour l'anticorps hGDD1(C), le blocage (8% lait dans TBS) était fait pour 1h à T.P., puis l'anticorps primaire (1 :500) était incubé pour la nuit à 4° dans le tampon de blocage et l'anticorps secondaire (Anti-Rabbit-IgG HRP, GE Healthcare, Little Chalfont, UK, 1 :5000), dans 3% BSA pour 1h à T.P. Pour Anti-Tetra-His, le blocage était fait avec 3%

BSA pour 1 h à T.P. et l'anticorps primaire (1 :1000) dans le tampon de blocage pour la nuit. L'anticorps secondaire (Anti-Mouse-IgG HRP, GE Healthcare, 1 :5000) était incubé dans le même tampon pour 1 h à T.P. Pour β -Actin, le blocage était fait dans une solution TBS 5% lait pour 1 h à T.P., puis l'anticorps primaire (1 :5000) et l'anticorps secondaire (1 :5000) étaient incubés dans ce même tampon, pour la nuit à 4°C et 1 h à T.P., respectivement. Pour l'anticorps Actin, le blocage était de 5% lait pour 1 h à T.P., l'anticorps primaire (1 :20000) dans 3% lait pour la nuit à 4°C, et l'anticorps secondaire (1 :10000) dans 3% lait pour 1h à T.P. La chemiluminescence était révélée par le système ECL-plus (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

Immunofluorescence

Pour l'immunofluorescence sur cellules, les cellules ont été fixées au PFA 4% (FD NeuroTechnologies) pour 15 min, puis rincées au PBS ou TBS. La perméabilisation et le blocage ont été faits pour 45 min à T.P. dans une solution de 0,2% triton, 5% lait, dans du PBS ou TBS. L'anticorps primaire (hGDD1(C), 1 :250; anti-V5, 1 :500; ou tetra-his, 1 :500) était incubé dans la solution de blocage avec agitation pour 1 h à T.P., puis rincé trois fois au PBS ou TBS. L'anticorps secondaire (1 :500) était incubé dans la solution de blocage avec agitation pour 1 h à T.P., puis rincé deux fois au PBS ou TBS contenant 0,05% triton. La coloration des noyaux a été faite par le marqueur Hoescht (Molecular Probes, Invitrogen) dilué 1 :10000. Les lamelles ont été montées sur lame avec 10 μ L de Fluoromount G (Southern Biotech. Hatfield, PA).

Pour l'immunofluorescence sur tissus humains, les lames étaient d'abord incubées (Figure 4.1E) ou non (Figure 4.4) dans un tampon citrate pH 6.0 (Dako, Glostrup, Danemark) pour 45 min à 95°C, puis tempérées pour 20 min à T.P. et rincées 2 fois au TBS. Un blocage Avidin-Biotin a été effectué en incubant les tissus pour 30 min dans une solution Avidin (2 gouttes / mL, Vector Laboratories), en rinçant 2 fois au TBS, puis en incubant pour 30 min dans une solution Biotin (2 gouttes / mL, Vector Laboratories), suivi de 2 lavages. Les

tissus ont ensuite été bloqués pour 1 h à T.P. dans le tampon de blocage (0,1M glycine, 3% BSA, 5% NGS, 0,25% triton dans TBS), suivi de 3 lavages au TBS. L'anticorps primaire (hGDD1(C), 1 :50; Abgent, 1 :50; Covalab, 1 :50; CAV3, 1 :100) a été incubé pour la nuit à 4°C dans la solution de blocage, puis lavé 5 fois avec du TBS contenant 0,25% triton. L'anticorps secondaire (Anti-rabbit biotinylé, 1 :500) a été appliqué dans la solution de blocage pour 1 h à T.P., puis rincé 5 fois au TBS-0,25% triton. Cette étape était répétée avec l'Avidin fluorescente (Av-488, 1 :500). Lorsqu'applicable, le marquage des noyaux (TOTO-3, Invitrogen) a été fait en diluant le marqueur 1 :1000 dans du TBS et en incubant les tissus dans cette solution pour 30 min à T.P. Le montage des lames a été réalisé avec le Fluoromount G.

Les coimmunofluorescences sur tissus murins ont été effectuées selon les mêmes conditions que l'immunofluorescence sur tissus humains, en incluant l'étape du démasquage au tampon citrate, et en utilisant l'anticorps ANO5 en première étape, suivi de l'anticorps secondaire biotinylé et de l'Avidin fluorescente. Après la dernière étape de lavage, l'immunofluorescence était reprise à l'étape du blocage des protéines, puis poursuivie avec le deuxième anticorps primaire (SERCA1, 1 :500; RyR, 1 :300; DHPR, 1 :150; OPA1, 1 :150; Nebulin, 1 :400; Dysferline, 1 :40) pour la nuit à 4°C, suivi de l'anticorps secondaire (goat Anti-mouse(IgG1)-647, 1 :500) et du marquage des noyaux (POPO-3, 1 :1000, Invitrogen).

Les lames ont été visualisées sur un microscope à fluorescence DM 6000B (Leica) ou sur un système de microscopie confocale TCS SP5 (Leica).

RT-PCR

Les conditions de synthèse du cDNA et d'amplification étaient les mêmes que celles décrites au chapitre 2.2. Les réactions PCR étaient effectuées dans un volume final de 10 uL en 5-plicata, puis combinées. Le temps d'élongation a été ajusté à 1 min 30 sec pour la

réaction M/L2, et à 3 min pour la réaction A/L2. Le temps d'élongation finale a été augmenté à 10 min.

Clonage TA

Le clonage des produits PCR a été fait dans le vecteur pCR-II-TOPO (pour les réactions M/L2) ou pCR-XL-TOPO (pour les réactions A/L2) (Invitrogen) en suivant les instructions du manufacturier (TOPO TA cloning et TOPO XL PCR cloning). Précédant le clonage dans le vecteur pCR-XL-TOPO, les fragments PCR d'un même échantillon ont été purifiés en isolant l'ensemble des bandes du gel coloré au cristal violet, en suivant le protocole fourni par le kit. Le séquençage des clones a été fait en utilisant les amorces m13-f, m13-r, G et H pour les clones M/L2 et m13-f, m13-r, V, T, J, S2 pour les clones A/L2 (séquences des amorces disponibles à l'**Annexe IV**). L'envoi des échantillons et l'analyse des séquences ont été effectués tel que décrit au chapitre 2.2.

Résultats

Localisation d'ANO5 à un compartiment cellulaire interne qui suit la ligne Z du muscle

Afin de localiser ANO5, nous avons testé trois anticorps polyclonaux dirigés contre différents épitopes d'ANO5 humain : deux disponibles commercialement (Covalab, Abgent) et un gracieusement fourni par l'équipe du Dr. Itakura (désigné hGDD1(C) ci-après) (**Figure 4.1A**).

Sur des lysats cellulaires transfectés avec une construction ANO5 humain étiquetée de V5 et de His (ANO5-V5-His), les trois anticorps ont détecté une bande autour de 100 kDa (taille attendue : 107 kDa sans l'étiquette) par immunoblot (**Figure 4.1B** et **4.S1A**). Par immunofluorescence, les trois anticorps ont détecté un marquage intracellulaire (**Figure 4.1C** et **4.S1C**), comparativement à une construction ANO6-His transfectée et détectée avec un anticorps α -His qui a montré une localisation intracellulaire et membranaire (**Figure 4.1C**). Une construction ANO5 sans étiquette (ANO5wt) ne se localise également pas de façon importante à la membrane lorsque transfectée (**Figure 4.1D**).

Sur des sections transversales de muscle humain contrôle, ANO5 ne se localise que très partiellement au sarcolemme, mais adopte plutôt un patron réticulé à l'intérieur de la fibre (**Figure 4.1E**, panneau de gauche). Sur des coupes longitudinales, ANO5 montre un marquage strié, similaire aux bandes du sarcomère (**Figure 4.1E**, panneau de droite et **Figure 4.2**). La même observation a été faite sur du muscle murin (**Figure 4.S2B**).

Afin de raffiner la localisation d'Ano5, nous avons procédé par co-immunofluorescence sur des sections longitudinales de muscle de souris avec des marqueurs de tubules transverses (T-tubules) et du réticulum sarcoplasmique (RS), deux structures produisant un patron strié

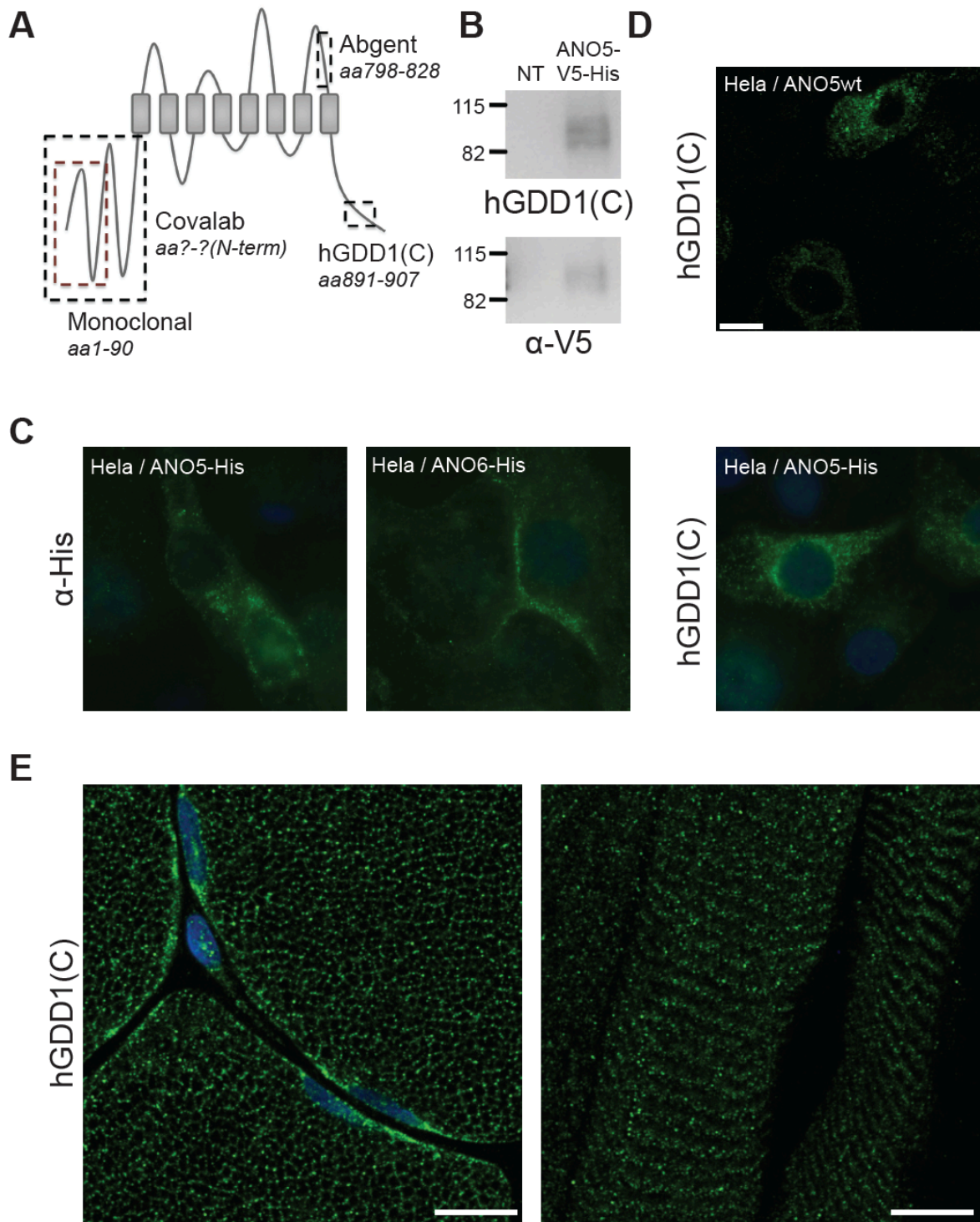


Figure 4.1 Localisation d'ANO5 humain à des compartiments cellulaires internes

(A) Positions des épitopes reconnus par les trois anticorps polyclonaux (en noir) et par l'anticorps monoclonal (en rouge) sur ANO5 humain. L'épitope utilisé par Covalab n'est pas dévoilé par la compagnie.

(B) Immunoblots produits en parallèle à partir de lysats cellulaires HEK transfectés avec ANO5-V5-His ou non. L'anticorps hGDD1(C) détecte une triple bande de même taille que celle détectée par l'anticorps V5. Le triplicat de la bande est causé par la glycosylation ([141] et H. Inoue, communication personnelle).

(C) Immunofluorescence sur des cellules Hela transfectées avec ANO5-V5-His ou ANO6-V5-His. L'anticorps hGDD1(C) détecte un marquage intracellulaire pour ANO5 de façon similaire à l'anticorps His, tandis qu'ANO6-His est détecté dans le cytoplasme mais aussi à la membrane plasmique. Objectif utilisé : 100X.

(D) L'anticorps hGDD1(C) détecte également par immunofluorescence un marquage intracellulaire pour ANO5 sans étiquette (ANO5wt) transfecté des cellules Hela. Microscopie confocale, barre : 10µm.

(E) Par immunofluorescence sur des sections transversales (panneau de gauche) et longitudinale (panneau de droite) de muscle contrôle humain avec l'anticorps hGDD1(C), ANO5 est détectée dans des structures réticulées (transversalement) et striées (longitudinalement). Microscopie confocale, barre : 10µm.

à l'intérieur de la fibre (**Figure 4.3**). Ano5 a montré une co-localisation partielle avec Serca1, un marqueur du RS longitudinal (**Figure 4.2A**), mais aucune co-localisation avec Dhpr (Dihydropyridine receptor, T-tubules) ni Ryr (Ryanodine receptor, citerne terminale du RS) (**Figure 4.2B,C**). Ano5 a également montré une co-localisation partielle avec Opa1 (Optic atrophy 1, mitochondrial) (**Figure 4.2F**), mais non avec Nebulin, une protéine sarcomérique entourant la ligne Z (**Figure 4.2D**). Ano5 ne co-localise pas avec Dysferline au sarcolemme (**Figure 4.2E**). Ces résultats suggèrent une localisation pour Ano5 à une structure qui suit la ligne Z du muscle strié (**Figure 4.3**).

Préservation de la localisation d'ANO5 pour un patient LGMD2L : rétablissement du cadre de lecture sur une proportion de transcrits grâce à l'épissage alternatif de l'exon 15

De façon inattendue, le marquage ANO5 était préservé (**Figure 4.4**) chez un patient LGMD2L (FC9-II :5) porteur homozygote d'une mutation provoquant la dégradation des transcrits (c.1295C>Gspl), telle que décrite au **Chapitre 3**. Sur immunoblot également, ANO5 était détectée de façon normale chez ce patient (**Figure 4.S2A**). Il est aussi possible, par RT-PCR, de détecter une certaine expression d'*ANO5* chez des patients homozygotes pour c.1295C>G (voir l'expression relative d'*ANO5* pour les cellules non-traitées des patients, qui est similaire ou même supérieure à celle des contrôles 1 et 2, Figure 3.3 de Bolduc *et al.* (**Chapitre 3**, [157])). Considérant cette expression résiduelle malgré le NMD, de même que l'important niveau de complexité d'épissage d'autres Anoctamines, en particulier ANO1 [167, 168], nous avons émis l'hypothèse que des événements d'épissage alternatif puissent favoriser le maintien des transcrits porteurs de la mutation c.1295C>G et puissent produire une protéine tronquée et partiellement fonctionnelle. En particulier, nous avons vérifié si le nouveau site d'épissage créé par la mutation pouvait faire jonction avec un exon subséquent à l'exon 14 et ainsi retrouver un cadre de lecture.

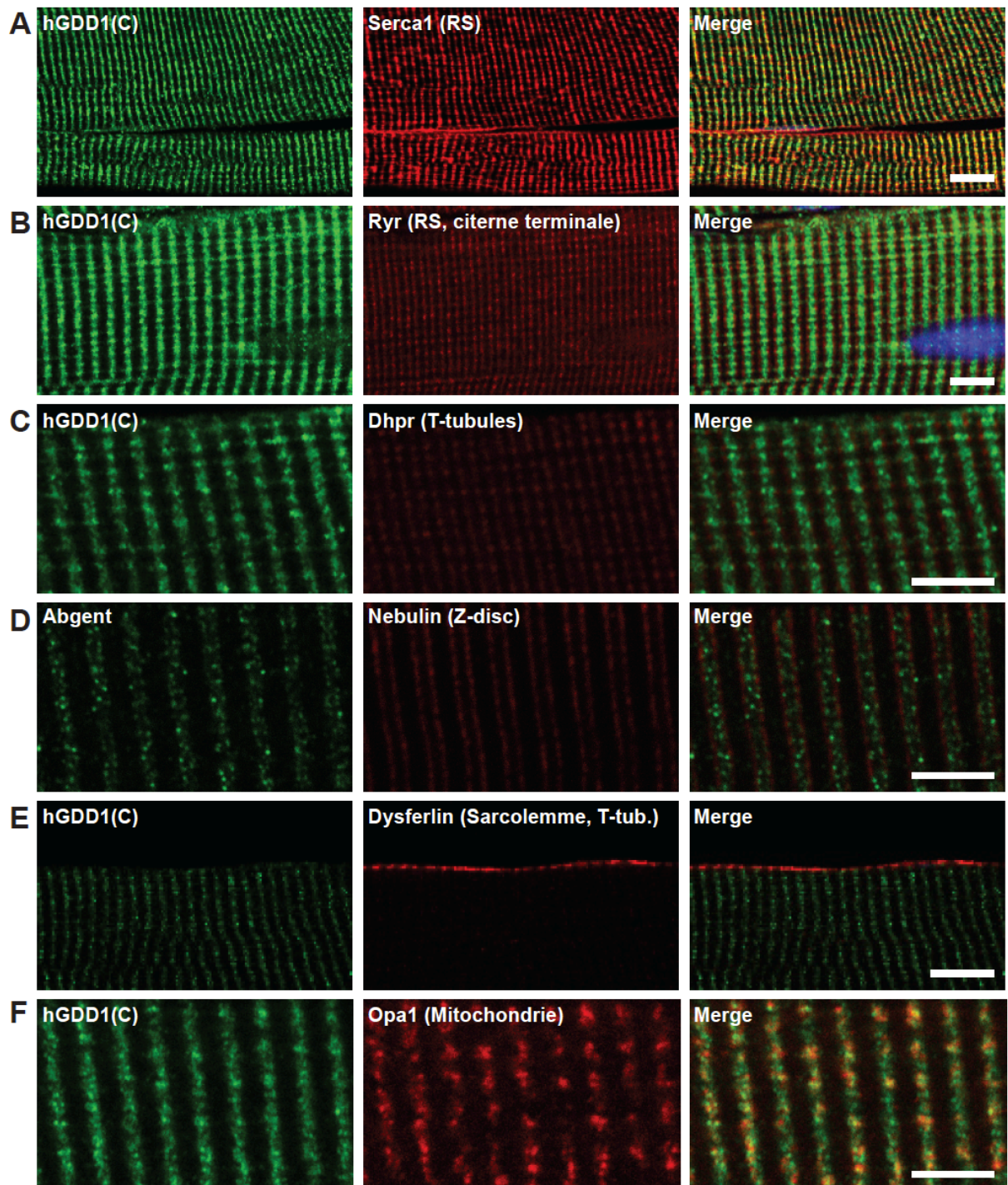


Figure 4.2 ANO5 se localise à une structure qui suit la ligne Z du muscle murin

(A-F) Les anticorps polyclonaux hGDD1(C) et Abgent détectent Ano5 à une structure striée sur des sections longitudinales de muscle (gastrocnemius) de souris. Ano5 co-localise de façon partielle avec Serca1 (RS longitudinal) et Opa1 (mitochondrie) (A, F), mais ne co-localise pas avec Dhpr (T-tubules), Ryr (citerne terminale du RS), Nebulin (entourant la ligne Z du sarcomère) et Dysferline (Sarcolemme et T-tubules) (B-E). Microscopie confocale, barres : 10µm.

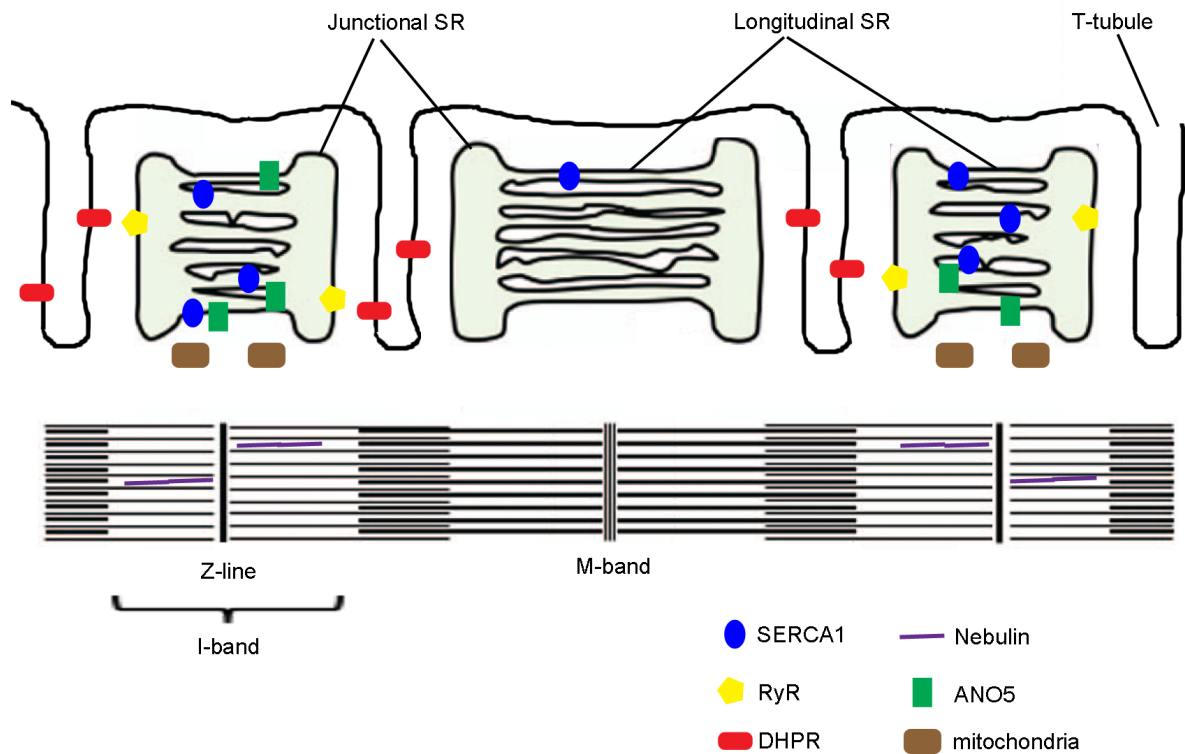


Figure 4.3 Localisation prédite pour ANO5

Représentation schématique de la position des protéines sarcomériques relativement aux protéines du réticulum saroplasmique (Junctional et Longitudinal SR) et des tubules transverses (T-tubules). ANO5 co-localise partiellement avec Serca1 (Longitudinal SR) et Opa1 (mitochondrie).

Image adaptée de Rossi et al., Traffic 2008 [169].

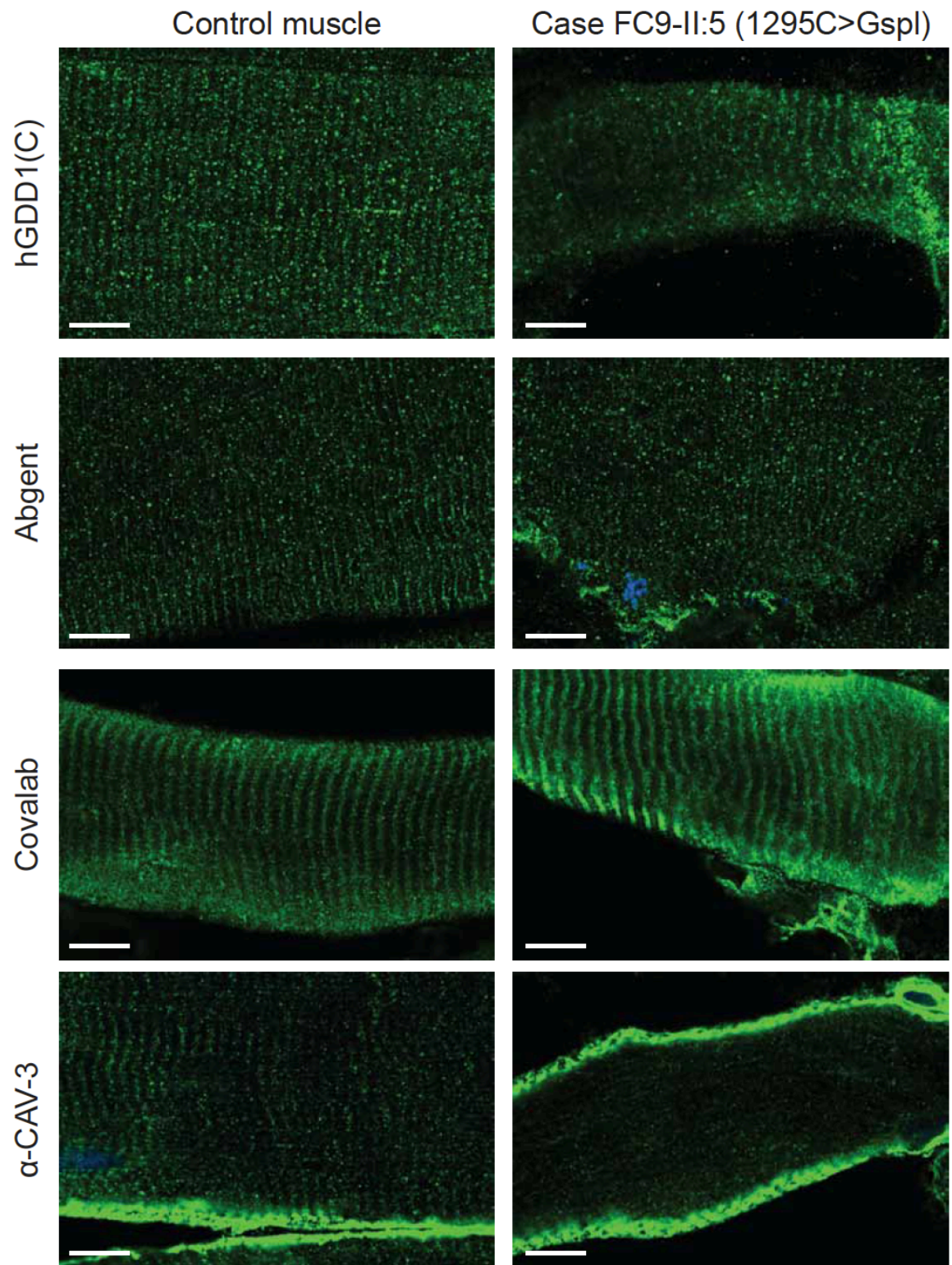


Figure 4.4 Caractérisation histologique du patient LGMD2L FC9-II :9

Détection d'ANO5 par immunofluorescence sur des sections longitudinales (5µm) du muscle d'un contrôle (panneaux de gauche) et du muscle du patient FC9-II :9, porteur homozygote de la mutation d'épissage c.1295C>G (panneaux de droite), avec chacun des trois anticorps polyclonaux et un anticorps α -Cavéoline 3 (α -CAV3). Microscopie confocale, barre : 10 µm.

La substitution c.1295C>G modifie la séquence interne de l'exon 13 (5'-AGCTATGT-3' > 5'-AGgtatgt-3') en y faisant apparaître un motif similaire à la séquence consensuelle du site donneur d'épissage, soit 5'-AGgu(g/a)agu-3' [170]. Ce nouveau site donneur obtient *in silico* des scores prédictifs plus élevés que le site donneur usuel, situé 38 nt en aval (2.028 contre 0.399 selon SplicePort [171], 90,24% contre 76,37% selon Human Splicing Finder [172], suggérant qu'il serait préférentiellement utilisé par la machinerie d'épissage. Par RT-PCR, en utilisant une amorce anti-sens à l'intérieur de l'exon 15 (amorce F, **Figure 4.5B**), nous n'avions observé qu'un fragment de taille inférieure pour le patient homozygote pour 1295C>G (**Figure 3.1C, Chapitre 3**), corroborant l'idée que cette mutation crée un site d'épissage qui est privilégié par rapport au site normal d'épissage. Pour vérifier si le site donneur d'épissage créé par la substitution c.1295C>G puisse faire jonction avec un exon subséquent à l'exon 14, nous avons reproduit le RT-PCR, cette fois en reculant l'amorce anti-sens initialement conçue à l'intérieur de l'exon 15 vers le 3'UTR (amorce L2, **Figure 4.5B**). Au moins un fragment supplémentaire, de taille inférieure, a été observé chez le patient homozygote pour c.1295C>G, FC9-II:9 (fragment 2, **Figure 4.5A**). Nous avons ensuite procédé à la ligation des réactions PCR dans un vecteur TOPO par les extrémités TA (TOPO-TA cloning). Les séquences de tous les clones générés pour le patient ont confirmé l'épissage aberrant à l'intérieur de l'exon 13 vers l'exon 14, ce qui entraîne la perte de 38 nucléotides (nt) (**Figure 4.5C, D**). Neuf de ces clones n'ont pas présenté d'autres variations de séquence, tandis que 12 ont montré de façon additionnelle un saut de l'exon 15 (**Figure 4.5C, D**). L'épissage de l'exon 15 soustrait 223 nt, en plus des 38 nt perdus, pour un total de 261 nt. Les épissages des exons 13 et 15 n'ont pas été observés chez les deux clones séquencés pour le contrôle (**Figure 4.5C**).

Le saut de l'exon 15 n'avait pas été rapporté dans les tissus de muscle et de cerveau chez la souris, dans l'étude de Tsutsumi *et al.* [137]. Dans cette étude, seuls les transcrits respectant le cadre de lecture avaient été compilés. Il est possible que l'exon 15 (223 pb), bien que non-symétrique (i.e. non-divisible par trois), soit sujet à l'épissage alternatif et que

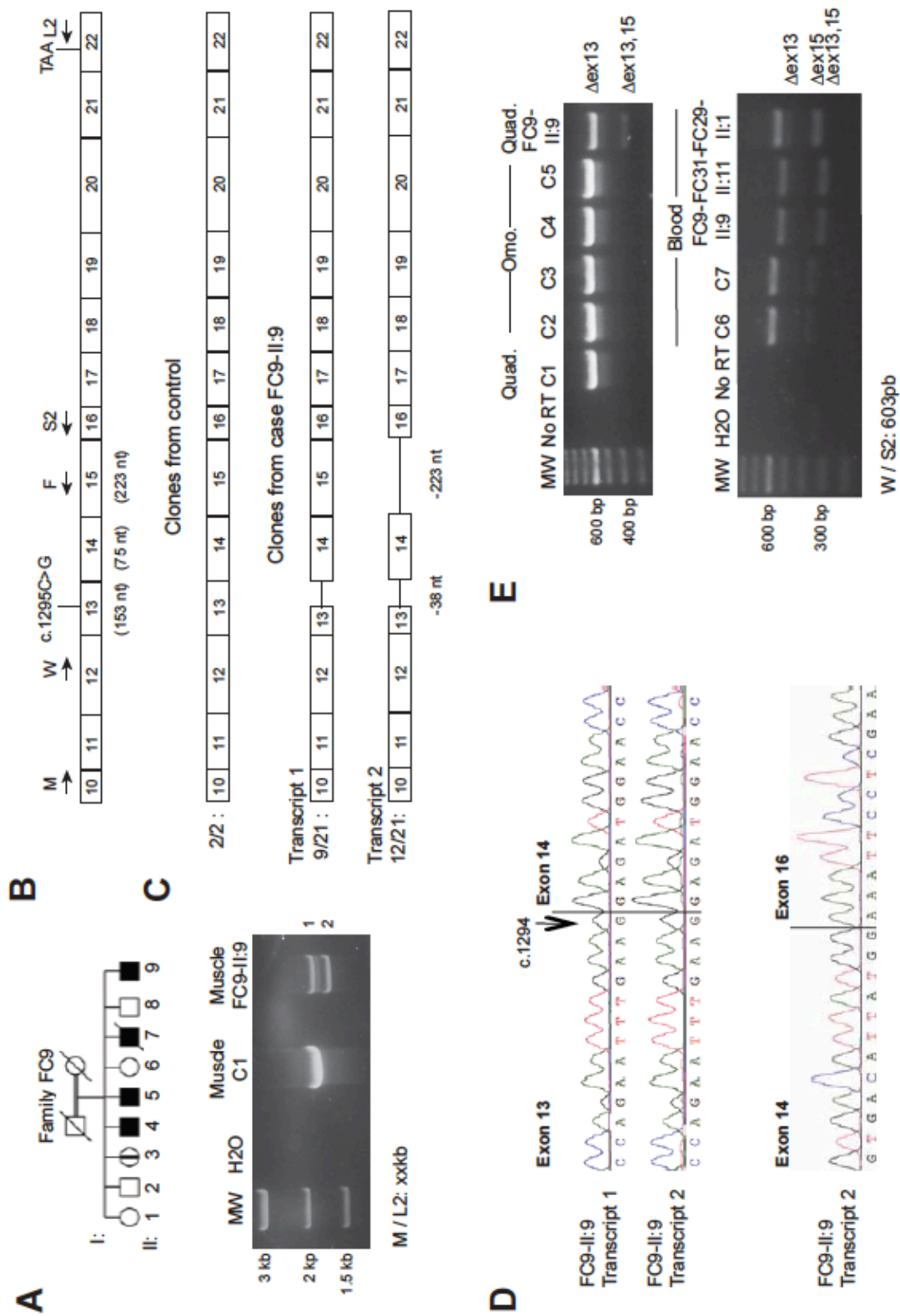


Figure 4.5 Le saut de l'exon 15 rétablit le cadre de lecture chez des transcrits porteurs de la mutation d'épissage c.1295C>G

(A) Pedigree de la famille LGMD2L FC9 chez laquelle les atteints sont porteurs homozygotes de la mutation d'épissage c.1295C>G (panneau du haut). Fragments de RT-PCR produits à partir du muscle d'un contrôle (C1) et d'un patient (FC9-II :9), en utilisant les amorces M et L2 (amplifiant de l'exon 10 au 3'UTR) (panneau du bas). Au moins trois fragments sont visibles pour le patient. Les produits de ces réactions PCR ont servi de produit de ligation pour le clonage dans le vecteur TOPO. MW=molecular weight.

(B) Position des amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR sur le transcrit d'ANO5, ici représenté de l'exon 10 à l'exon 22.

(C) Représentation schématique des séquences lues sur deux clones du contrôle et sur 21 clones du patient (panneau du bas). Les 21 clones du patient montraient l'épissage aberrant de l'exon 13 (-38 pb), mais 12 montraient également un saut de l'exon 15 (transcrit 2, -223 pb).

(D) Chromatogrammes des séquences représentant la jonction de l'épissage aberrant de l'exon 13 à 15 pour les transcrits 1 et 2 du patient, et l'épissage de l'exon 15 pour les transcrits 2.

(E) Fragments de RT-PCR produits sur des échantillons de muscle (panneau du haut) ou de lymphocytes (panneau du bas) en utilisant les amorces W et S2, qui couvrent de l'exon 12 à l'exon 16. L'épissage de l'exon 15 uniquement produit un fragment de 380 pb, l'épissage de l'exon 15 en combinaison à l'épissage aberrant de l'exon 13 produit un fragment de 342 pb. Un fragment de 380 pb est observé chez deux échantillons contrôles de lymphocytes, mais non chez les échantillons contrôles de muscle. Le patient FC31-II :11 montre également un fragment de 342 pb. Omo.=muscle omohyoïdien; Quad.=muscle quadriceps; No RT=contrôle sans transcriptase reverse.

son exclusion seule favorise la dégradation de l'ARN messager par la voie médiée par une troncation prématurée (« nonsense-mediated RNA decay, NMD »), ce qui nuirait à l'observation de cet événement d'épissage dans un tissu qui exprime fortement *ANO5*. Le couplage de cet épissage alternatif au NMD pourrait être une façon pour la cellule d'effectuer une régulation post-transcriptionnelle de l'expression d'*ANO5* dans certains tissus ou sous certaines conditions [173]. Par RT-PCR sur cinq muscles contrôles (quadriceps : C1, muscles omohyoïdiens : C2-C5) en utilisant des amorces situées dans les exons 12 et 16 (amorces W et S2, **Figure 4.5B**), un fragment de 380 pb, qui correspondrait à l'épissage de l'exon 15, n'a pas été observé (**Figure 4.5E, panneau du haut**). Chez le patient d'une autre famille homozygote pour c.1295C>G (FC31-II :11, **Chapitre 3**), le saut de l'exon 15 a également été observé en combinaison avec l'épissage aberrant de l'exon 13 dans les cellules lymphocytaires (**Figure 4.5E, panneau du haut**). Par contre, dans les cellules lymphocytes de deux individus contrôles, un fragment de 380 pb a été observé (**Figure 4.5E, panneau du bas**), qui pourrait correspondre à l'épissage de l'exon 15 (fragment non-séquencé), suggérant que cet événement d'épissage alternatif puisse survenir dans plus d'un tissu et qu'il puisse être plus aisé de l'observer dans un tissu qui exprime plus faiblement *ANO5*, comme le sang.

Par clonage et séquençage de fragments RT-PCR issus du muscle du patient FC9-II:5 et couvrant la séquence complète d'*ANO5* (du 5' au 3'UTR) (**Figure 4.6A**), nous avons observé pour trois clones (3/12, 25%) le double épissage (épissage aberrant de l'exon 13, puis saut de l'exon 15) sans autre variation de la séquence (**Figure 4.6B**), suggérant que cet isoforme, qui conserve un cadre de lecture malgré la présence de la mutation c.1295C>G, est produit dans le muscle du patient. Ces modifications se traduiraient par une délétion de 111 acides aminés (aa) et une insertion de 24 aa (**Figure 4.6C**), pour une perte nette de 87 aa (10 kDa), ce qui retrancherait les domaines transmembranaires TM3 et TM4 et ajouterait une nouvelle séquence dans la première boucle intracellulaire (**Figure 4.6D**). Ces modifications n'affecteraient aucun des trois épitopes des anticorps Covalab, Abgent et

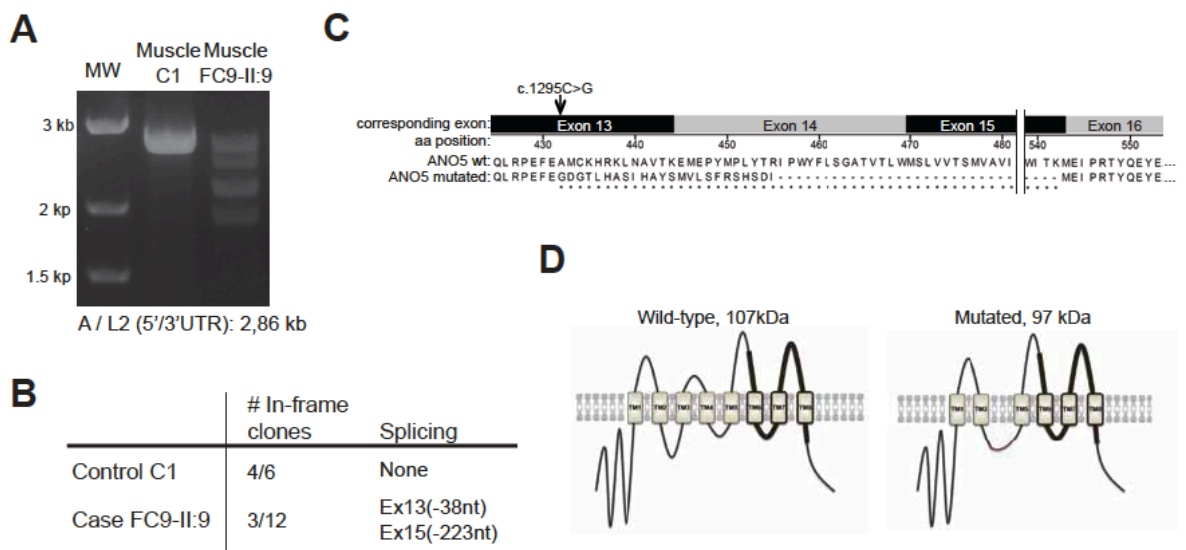


Figure 4.6 Isolation d'un transcrit *ANO5* complet avec cadre de lecture chez un patient porteur de la mutation c.1295C>G

(A) Fragments de RT-PCR produits à partir du muscle d'un contrôle (C1) et d'un patient (FC9-II :9), en utilisant les amorces A et L2 (amplifiant du 5' au 3'UTR). Plus d'un fragment est visible pour le patient. Les produits de ces réactions PCR ont été clonés dans le vecteur TOPO-XL.

(B) Le séquençage des clones produits en (A) a identifié 4/6 clones du contrôle C1 et 3/12 clones du patient FC9-II :9 qui ont conservé un cadre de lecture. Les quatre clones du contrôle portaient les 22 exons d'*ANO5*, tandis que les trois clones du patient montraient un épissage aberrant de l'exon 13 (-38 pb), de même qu'un saut de l'exon 15 (-223 pb). Ce transcrit amplifié en utilisant les amorces A/L2 produirait un fragment de 2.59 kb.

(C) Le transcrit du patient FC9-II :9 décrit en (B) serait amputé de 111 acides aminés (aa), mais incorporerait 24 nouveaux aa.

(D) Les modifications décrites en (C) se traduiraient par l'expression d'une protéine ayant un poids moléculaire réduit de 10 kDa, à laquelle il manquerait deux domaines transmembranaires (TM3 et TM4) et où apparaîtrait une nouvelle boucle intracellulaire entre les TM2 et TM5.

hGDD1(C), ce qui rendrait possible la détection de la protéine partiellement tronquée par ces anticorps.

Discussion

Chez deux patients porteurs homozygotes de la mutation c.1295C>G (FC9-II :9 et FC31-II :11), nous avons montré une hausse de la dégradation des transcrits *ANO5* médiée par une troncation prématurée (nonsense-mediated RNA decay, NMD), ce qui nous avait porté à conclure à une perte de fonction pour ces mutations (voir **Figure 3.3**) [157]. Cette expérience de NMD avait parallèlement mis en évidence l'expression accrue d'*ANO5* pour ces deux patients lorsque le NMD était inhibé, comparativement à trois contrôles (assortis pour l'âge et le sexe), suggérant la surexpression d'*ANO5* dans les cellules des patients. En immunofluorescence sur des coupes histologiques d'un de ces patients, nous avons observé la préservation du marquage ANO5 et ce, en utilisant trois anticorps différents. Ce résultat étonnant pourrait être expliqué par une non-spécificité des anticorps. Cependant, ces anticorps ont été développés contre trois épitopes différents d'ANO5. Par une recherche d'homologie *in silico* (« blast p »), les épitopes des anticorps hGDD1(C) et Abgent n'ont pas montré de façon significative de similitude avec d'autres protéines. Afin de valider l'anticorps hGDD1(C), nous avons également montré qu'il ne pouvait détecter sur immunoblot ANO1, ANO6, ni ANO8, trois des Anoctamines dont l'expression a été décelée dans le muscle squelettique [163] (**Figure 4.S1B**). Nous avons développé un anticorps monoclonal contre un épitope N-terminal (épitope illustré à la **Figure 4.1A**) qui, pour l'instant, donne une réponse comparable aux autres anticorps en immunofluorescence (résultats non-montrés). L'accès à des cellules chez lesquelles l'expression d'*ANO5* a été complètement abolie (par « knock-out » ou « knock-down », par exemple) serait crucial pour valider la spécificité des anticorps. Notre tentative de réduire l'expression d'*ANO5* à l'aide de combinaisons de siRNA dans une lignée cellulaire dont l'expression endogène est élevée, comme les Saos [137], s'est pour l'instant avérée infructueuse. Alternativement, considérant le haut niveau de complexité d'épissage que peuvent montrer les Anoctamines [167, 168], nous avons soulevé l'hypothèse que des événements d'épissage alternatif chez les patients porteurs de la mutation c.1295C>G pourraient rétablir le cadre de lecture et

produire une protéine ANO5 toujours détectable par les anticorps. Par clonage d'amplicons RT-PCR englobant les 22 exons d'*ANO5*, nous avons mis en évidence la présence de transcrits montrant un épissage aberrant à l'exon 13 en raison de la mutation c.1295C>G, mais excluant aussi l'exon 15, de sorte qu'un cadre de lecture était conservé. Le saut de l'exon 15 n'a pas été observé lors du séquençage des clones RT-PCR provenant de l'échantillon contrôle de muscle, ni n'a été détecté dans le muscle de quatre patients DMOP, laissant présager la tendance du muscle à inclure systématiquement cet exon durant l'épissage des ARN pré-messagers. Au contraire, le tissu sanguin semble à l'occasion assujettir l'exon 15 à l'épissage alternatif, même chez les sujets contrôles. La question demeure entière à savoir par quel mécanisme le muscle, en conditions pathologiques, peut réactiver un tel événement d'épissage. Les transcrits portant l'épissage aberrant à l'exon 13 et le saut de l'exon 15 produiraient une protéine ANO5 amputée de deux domaines transmembranaires, mais pour laquelle les épitopes reconnus par les anticorps seraient préservés. Sur immunoblot, nous n'avons pu démontrer la présence de cette protéine dont le poids moléculaire serait réduit de 10 kDa; au contraire, nous avons observé une bande de taille identique chez le patient FC9-II :9 (**Figure 4.S2A**). Sur un gel 7,5% d'acrylamide, cette différence de taille devrait être visible, à moins que des modifications post-traductionnelles ne modifient sa taille, ANO5 étant connue pour être glycosylée [141]. Par ailleurs, la bande détectée à partir des extraits de tissus est de taille plus élevée que celle dans les extraits de cellules transfectées (**Figure 4.S1 et 4.S2**). Néanmoins, la possibilité demeure que ces anticorps ne reconnaissent pas spécifiquement ANO5 en immunoblot. ANO5 est une protéine à multiples domaines transmembranaires qui pourrait former des agrégats lors de l'extraction protéique et qui entraverait sa détection. L'anticorps monoclonal que nous avons développé génère pour l'instant des résultats inconsistants en comparaison aux anticorps polyclonaux en immunoblot (résultats non-montrés).

En accord avec d'autres études [140, 163], nos résultats suggèrent qu'ANO5 ne se localise pas de façon importante à la membrane plasmique. Sans employer d'anticorps α -ANO5, il

est possible d'observer une rétention au cytoplasme des constructions ANO5-GFP (résultats non-montrés) et ANO5-V5-His exprimés de façon exogène dans divers types, contrairement à d'autres Anoctamines exprimées de telle façon (**Figure 4.1C** et [163]), ce qui suggère un rôle pour ANO5 dans un compartiment interne ou dans des vésicules de la fibre musculaire. Un autre exemple d'une Anoctamine qui a un rôle à l'intérieur de la cellule est l'homologue chez la drosophile, Axs, qui co-localise avec le réticulum endoplasmique et la structure enveloppant le fuseau méiotique [174, 175].

À la lumière des résultats obtenus grâce aux anticorps polyclonaux, ANO5 adopterait un patron strié dans le muscle et se localiserait à une structure qui suit la ligne Z, tel le réticulum sarcoplasmique. De façon intéressante, deux études antérieures ont rapporté la présence d'un canal chlore activé par le calcium dans des compartiments internes de la cellule, soit dans les endosomes de rein [176] et dans le réticulum sarcoplasmique (RS) du muscle squelettique de lapin [147]. Les canaux décrits dans ces deux études partagent plusieurs caractéristiques, dont la dépendance au voltage (activité accrue à des potentiels négatifs) et l'activation par l'augmentation cytoplasmique (et non luminale) de calcium, bien qu'ils réagissent à des concentrations de calcium différentes. Le canal CaCC isolé du RS est activé à des concentrations similaires à celles retrouvées près du site de relâche de calcium, dans la citerne terminale du RS, et pourrait être actif durant la recapture du Ca^{2+} par le RS. Les auteurs de cette étude suggèrent que le canal puisse servir de « contre-ion » pour équilibrer le potentiel membranaire du RS durant les changements causés par le flux de Ca avant et après la contraction [147]. Comme autre rôle potentiel, ce canal CaCC pourrait être impliqué dans divers processus endosomaux, dont la régulation du volume des endosomes et le contrôle du trafic vésiculaire vers la membrane plasmique [176]. Dans le contexte où le processus de réparation membranaire est perturbé dans les cellules d'un patient ANO5 [136], et sachant qu'en microscopie électronique nous n'observons pas d'accumulation de vésicules au site de ruptures membranaires, il est tentant de spéculer qu'ANO5, au réticulum sarcoplasmique, puisse fonctionner comme un transporteur

chlorique qui serait activé lors de l'entrée de calcium dans le sarcoplasme suite à une rupture, et qui favoriserait la formation et le transport des vésicules vers la membrane. Dysferline est la première composante identifiée de cette voie de réparation membranaire [102] et des mutations à ce gène sont aussi responsables d'une dystrophie musculaire des ceintures (LGMD2B) et de la myopathie de Miyoshi (MMD1) [17, 30]. Chez ces patients, il est présumé qu'une fusion défective des vésicules entre elles et avec le sarcolemme due à la déficience en Dysferline empêche la cellule de colmater efficacement les brèches et qu'au fil du temps, il y a augmentation de nécrose [166]. Une fonction de « scramblase » pour ANO5 dans un compartiment interne de la fibre serait aussi compatible avec un rôle dans le transport vésiculaire. L'exposition de phospholipides à la surface externe d'une vésicule en réponse à l'augmentation intracellulaire de calcium pourrait servir de marqueur pour les protéines responsables de transporter les vésicules.

Une étude plus raffinée de la localisation d'ANO5 dans la fibre musculaire serait requise pour préciser le compartiment dans lequel il se situe. Bien qu'ANO5 montrait une co-localisation avec le RS, il montrait également une co-localisation partielle avec un marqueur de la mitochondrie, OPA1. Les membranes associées aux mitochondries (MAMs) composent une structure qui est peu étudiée dans le muscle squelettique, mais qui relie le RS aux mitochondries et qui serait impliquée entre autres dans l'homéostasie du calcium, la biosynthèse des phospholipides et la réponse au stress cellulaire [177].

Notre étude des variants d'épissage chez un patient porteur homozygote de la mutation c.1295C>G suggère que la dystrophie musculaire, du moins dans le cas des patients porteurs de cette mutation, puisse être le résultat d'une perte partielle, et non totale, de la protéine. Également, nos résultats suggèrent qu'ANO5 se localise à une structure qui suit la ligne Z. Le développement de nouveaux anticorps est primordial pour poursuivre la caractérisation d'ANO5 et pour acquérir une meilleure connaissance de sa localisation dans

la fibre musculaire, ce qui est préalable à l'étude de sa fonction potentielle en tant que canal chlore activé par le calcium ou que « scramblase ».

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les Dr Mitsuo Itakura, Hiroshi Inoue, Kuniko Mizuta et Nobuyuki Kamata pour l'anticorps ANO5 (hGDD1-C) et la construction ANO5-V5-His, de même que les Dr Rainer Schreiber et Karl Kunzelmann pour les constructions ANO1-His, ANO5-His, ANO6-His et ANO8-His. Les auteurs remercient également Martine Tétreault pour l'assistance au clonage de fragments RT-PCR. V.B. a obtenu une bourse d'études des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC). Cette étude a été réalisée avec l'aide financière de l'Association américaine de Dystrophie Musculaire (MDA 131863).

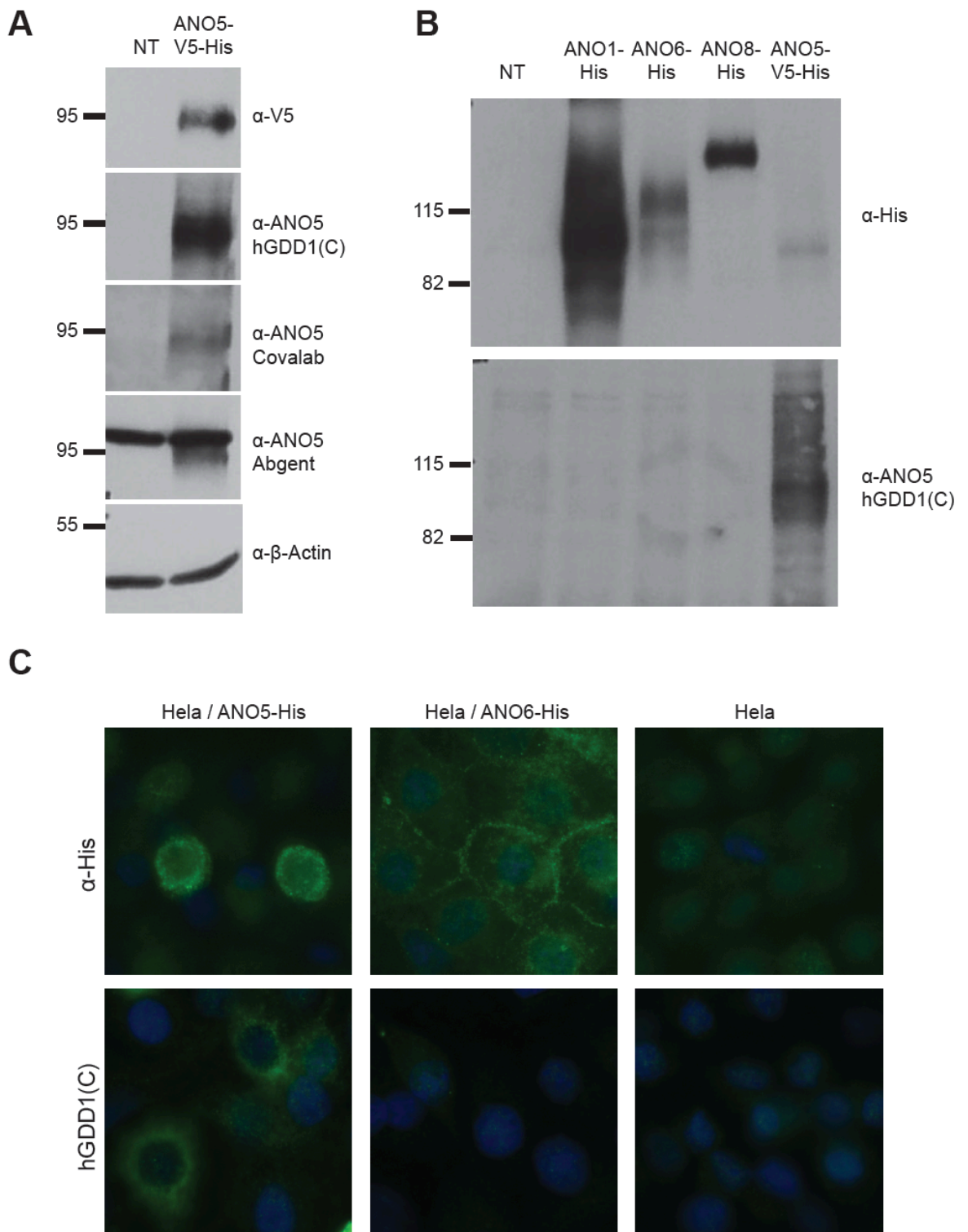


Figure 4.S1 Caractérisation des anticorps ANO5 sur des cellules surexprimant ANO5

(A) Les trois anticorps ANO5 (hGDD1(C), Covalab et Abgent) détectent une bande de taille similaire à celle reconnue par l'anticorps V5 sur des immunoblots produits en parallèle d'extraits cellulaires Hela sur-exprimant ANO5-V5-His. Seul l'anticorps Abgent détecte également une bande de taille légèrement supérieure, visible dans l'extrait cellulaire non-transfecté (NT).

(B) L'anticorps hGDD1(C) détecte ANO5-V5-His, mais non ANO1-His, ANO6-His, ni ANO8-His sur immunoblot d'extraits cellulaires Hela surexprimant ces protéines. Tailles attendues : ANO1, 114 kDa; ANO6, 106 kDa; ANO8, 136 kDa; ANO5, 107 kDa.

(C) L'anticorps hGDD1(C) détecte ANO5-His et non ANO6-His sur immunofluorescence de cellules Hela transfectées avec les constructions ANO5-His et ANO6-His ou non-transfectées (Hela). Microscopie à fluorescence, objectif 40X.

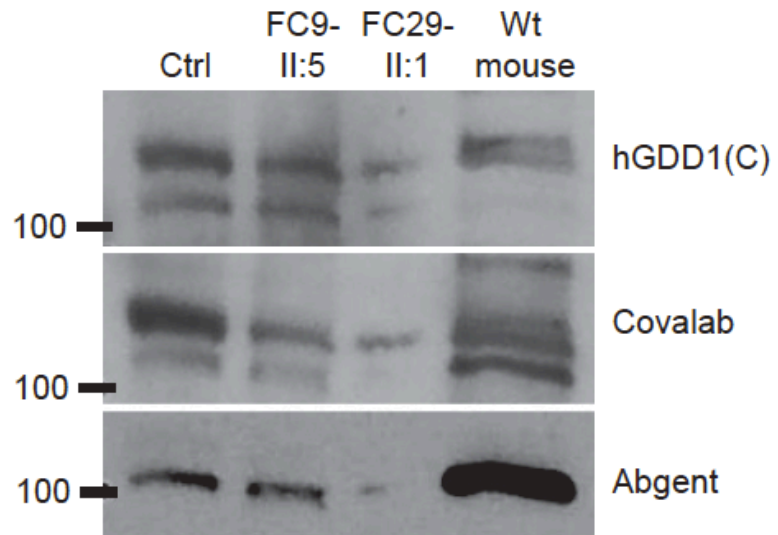
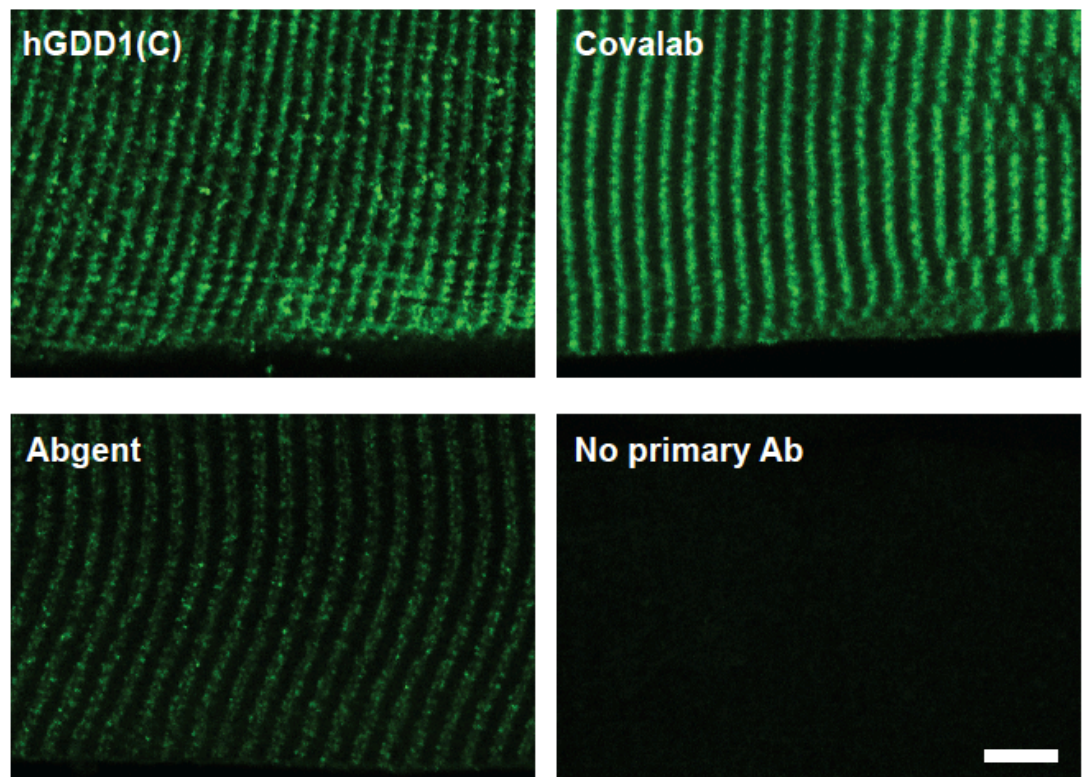
A**B**

Figure 4.S2 Caractérisation des anticorps ANO5 sur tissus musculaires (humains et souris)

(A) Extraits musculaires détectés sur immunoblot par chacun des anticorps ANO5 (hGDD1(C), Covalab, Abgent) pour un échantillon contrôle, les patients LGMD2L FC9-II :5 (porteur homozygote de la mutation c.1295C>G) et FC29-II :1 (porteur hétérozygote des mutations c.191dupA et G231V), et d'un échantillon de souris.

(B) Les trois anticorps ANO5 détectent un patron strié sur du muscle murin normal en coupe longitudinale. Microscopie confocale, barre :5 µm.

CHAPITRE 5 – Conclusions et directions futures

Les LGMD sont reconnues comme un groupe génétiquement hétérogène : à ce jour, 21 gènes/loci ont été associés à une forme de LGMD (LGMD1A-G, LGMD2A-N). Malgré les progrès réalisés dans les 15 dernières années pour identifier ces gènes mutés, une proportion significative de patients LGMD, variant entre 25% et 78% [31, 49-53], est toujours sans diagnostic moléculaire, indiquant que d'autres gènes mutés sont encore à découvrir. Bien qu'aucun traitement ne soit disponible pour l'instant, le diagnostic précis du sous-type LGMD est essentiel pour la prise en charge optimale des patients, la surveillance du risque de complications cardiaques ou respiratoires et le conseil génétique. L'identification des mutations causales est cruciale pour le diagnostic, mais elle l'est également pour étudier la pathogenèse et éventuellement développer des outils thérapeutiques.

5.1 Caractérisation des anoctaminopathies 5 (LGMD2L et MMD3)

Notre découverte de mutations au gène *ANO5* responsables d'une forme de LGMD a révélé un important sous-type de LGMD, reflété par une prévalence élevée dans certaines populations [152]. L'ajout de la détection de mutations *ANO5* à l'algorithme de diagnostic des LGMD contribuera positivement à améliorer la précision et le taux de réussite de ce dernier. Quoiqu'il puisse paraître étonnant au premier abord qu'une forme si fréquente de LGMD n'ait pas été identifiée plus tôt, nous croyons que la variabilité inter- et intrafamiliale, de même que le mode de transmission récessif dans de petites familles [152], aient contribué à ce que les cas d'Anoctamine 5 ne soient pas regroupés pour fins de clonage positionnel. Nous avons eu accès aux échantillons d'une grande famille canadienne-française (quatre atteints, quatre non-atteints), consanguine au premier degré (Famille FC9, [119, 157]), grâce à laquelle nous avons identifié les premières mutations *ANO5*. En interrogeant notre banque de patients atteints de LGMD de type indéterminé, nous avons identifié deux familles additionnelles. Contrairement à notre hypothèse de

départ, ce n'est pas grâce à un effet fondateur de la LGMD2L au Québec que nous sommes parvenus à identifier *ANO5*.

Les sept cas canadiens-français que nous avons décrits présentaient une faiblesse et une atrophie proximale, particulièrement évidente au niveau des biceps brachii, de la partie médiale et intermédiaire du quadriceps, des ischiojambiers, et de l'adductor magnus [119], qui progressaient parfois vers une légère atrophie des gastrocnemii, non-accompagnée de faiblesse [157]. Les muscles ilipsoas, gracilis et sartorius étaient épargnés [119]. Les symptômes débutaient à l'âge adulte (entre 20 et 55 ans), et les CK étaient élevés de façon importante (>1000 IU à >8000) [157]. La description de 20 cas additionnels de LGMD2L par un groupe britannique a confirmé ce que nous avons décrit (**Tableau 5.1**, [152]), à l'exception que les auteurs de cette étude concluent à une homogénéité du phénotype, tandis que nous concluons à une variabilité phénotypique, visible de façon inter- mais aussi intrafamiliale. L'étude britannique a été réalisée sur des cas exprimant pour la majorité la même mutation (c.191dupA) et issus de petites familles (maximum de 2 frères ou soeurs par famille), ce qui a pu contribuer à rendre le phénotype plus homogène. Néanmoins, grâce à ces deux études, nous sommes aujourd'hui en mesure de dégager certains aspects de la clinique qui contribuent à orienter le diagnostic vers *ANO5*, à savoir la bonne performance physique antérieure à l'apparition des premiers symptômes, le début des symptômes qui ne survient pas avant l'âge adulte, l'atteinte plus importante des muscles des extrémités inférieures comparativement aux supérieures, l'élévation prononcée des taux de CK, la myalgie et l'asymétrie de l'atteinte [152, 157]. La hausse importante des taux de CK est une caractéristique de plusieurs LGMD, en particulier LGMD2A (Calpaïne-3), LGMD2B (Dysferline), LGMD2C-F (Sarcoglycanes), LGMD2I (FKRP) et LGMD2J (Titine) [31]. L'âge tardif d'apparition des symptômes peut être observé chez pratiquement toutes les formes de LGMD, à la différence que des cas plus juvéniles ont aussi été rapportés dans toutes les formes de LGMD, contrairement à la LGMD2L. La bonne performance physique avant l'apparition des symptômes et la différence entre les membres

Tableau 5.1 Le phénotype LGMD2L

Clinical characteristic	Number of patients
Increased serum creatine kinase value ($> 10 \times$)	20/20
Proximal lower limb weakness	20/20
Adult onset (> 20 years)	19/20
Muscle atrophy	19/20
Quadriceps/hamstrings atrophy	15/20
Calf (medial part) atrophy	14(8)/20
Quadriceps/hamstrings and calf muscle atrophy	10/20
Upper limb muscle atrophy (mainly biceps)	7/20
Asymmetry of muscle weakness or atrophy	18/20
Distal lower limb weakness	17/20
Distal lower limb weakness (mild)	13/20
Distal lower limb weakness (moderate to severe)	5/20
Upper limb proximal weakness	13/20
Upper limb proximal weakness (mild)	11/20
Upper limb proximal weakness (moderate to severe)	2/20
Good sporting performance in presymptomatic period	8/20
Knee hyperextension	7/20
Scapular winging	6/20
Restriction/loss of ambulation	4/20
Contractures	4/20
Myoglobinuria	3/20

Tiré de Hicks et al., Brain 2011 [152].

supérieurs et inférieurs sont au contraire plutôt rares, mais ont déjà été décrits dans des cas de LGMD2B [23, 31]. Ainsi, seule l'asymétrie est un signe clinique distinctif de la LGMD2L, n'ayant jamais été rapportée de façon constante dans aucune autre forme de LGMD, sauf en quelques occasions chez des patients LGMD2B (Dysferline) [18] et MMD1 (Miyoshi muscular dystrophy, Dysferline) [23]. La différence entre les hommes et les femmes est aussi un aspect important à souligner, bien que le nombre encore limité de cas féminins ANO5 décrits dans la littérature nous empêche de nous prononcer avec certitude sur une différence de genre.

Récemment, le cas d'une patiente souffrant de douleurs musculaires et d'intolérance à l'exercice depuis l'enfance, accompagnées de rhabdomyolyse et d'amyloïdose (dépôts d'amyloïde dans les vaisseaux sanguins irriguant le muscle), a été décrit, chez qui il a été découvert plus tard une élévation prononcée des CK et une faiblesse proximale affectant les muscles inférieurs [153]. La détection de mutations au gène *Dysferline* s'est avérée négative, bien que l'amyloïdose était jusqu'à ce moment considérée comme un signe distinctif des dysferlinopathies [178, 179]. Cette patiente était porteuse « compound heterozygote » de deux mutations *ANO5* précédemment décrites: c.191dupA et Y673C. À ce stade, il reste à démontrer si l'amyloïdose est un signe pathologique récurrent chez les patients *ANO5*, mais ce premier cas indique qu'il s'agit d'un signe à surveiller.

À l'instar de plusieurs autres gènes associés à des LGMD, des mutations au gène *ANO5* sont aussi responsables d'un autre phénotype musculaire, ici la dystrophie musculaire distale de Miyoshi sans déficience en dysferline (MMD3) [157], de même que d'un phénotype squelettique, la dysplasie gnatho-diaphyseale (GDD) [140]. Les trois cas néerlandais et les deux cas finnois MMD3 que nous avons identifiés comme porteurs de mutations *ANO5* présentaient d'abord une atteinte des gastrocnemii (faiblesse et difficulté à se tenir sur le bout des orteils chez les cas néerlandais, hypertrophie et douleur chez les cas finnois) [157, 180, 181]. Des études de scan CT et d'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez ces patients ont mis en évidence l'asymétrie de l'atteinte. Chez un cas néerlandais, les muscles inférieurs proximaux atteints étaient les ischiojambiers, les adductor magnus et les vastus intermedialis, tandis que les gracilis et sartorius étaient épargnés, ce qui est comparable avec la distribution chez nos patients LGMD2L canadiens-français [119]. De façon très intéressante, une analyse IRM longitudinale chez un des cas finnois a montré que l'atteinte des ischiojambiers était une manifestation qui survenait de façon séquentielle après l'atteinte des gastrocnemii [181]. Certains patients LGMD2L, à l'opposé, ont développé une légère faiblesse des gastrocnemii plus tardivement à la faiblesse proximale [152, 157]. Ainsi, bien que les manifestations initiales de la LGMD2L

et de la MMD3 soient distinctes, la progression de la maladie fait chevaucher les manifestations et fait émerger un phénotype quelque peu à mi-chemin entre la LGMD2L et la MMD3. Cette dualité de phénotype rappelle les dysferlinopathies, pour qui des mutations à la *Dysferline* peuvent être responsables d'une dystrophie proximale (LGMD2B) ou distale (MMD1) et pour qui l'atteinte à la fois des muscles proximaux et distaux est apparente chez tous les patients en cours de progression [18, 23, 34]. La terminologie « dysferlinopathie » a d'ailleurs été adoptée pour unifier le spectre de phénotypes résultant de mutations dans le même gène. Dans cette optique, nous proposons le terme « anoctaminopathie 5 » pour englober LGMD2L, MMD3 et GDD. À ce jour, le phénotype de LGMD2L est plus prévalent que celui de MMD3, et seules les mutations c.191dupA et R758C ont été associées à ce dernier [154, 157, 181].

Les causes sous-jacentes à l'hétérogénéité phénotypique associée aux mutations *ANO5* sont à ce stade équivoques. Dans une certaine mesure, l'hétérogénéité allélique due aux diverses mutations identifiées (19 à ce jour) pourrait en être responsable. Néanmoins, une même mutation *ANO5* est capable d'induire chacun des deux phénotypes (LGMD2L ou MMD3). Par exemple, les patients de la famille néerlandaise que nous avons décrite [157] étaient homozygotes pour la mutation c.191dupA et présentaient un phénotype MMD3; tandis que plusieurs des patients européens décrits par Hicks *et al.* [152] étaient également porteurs homozygotes de la même mutation, mais présentaient le phénotype LGMD2L. De façon similaire, une même mutation peut s'exprimer de façon variable à l'intérieur d'une même famille. Par exemple, chez les atteints des familles canadiennes-françaises FC9 et FC31 (voir les pedigrees à la **Figure 3.1A**), tous homozygotes pour la mutation d'épissage, les deux sœurs présentaient des phénotypes considérablement moins sévères que leurs frères, à tel point qu'elles étaient asymptomatiques. Ces variabilités inter- et intrafamiliales, qui ont été observées chez les anoctaminopathies 5, mais aussi chez plusieurs autres dystrophies musculaires [25, 26, 182, 183], quant à l'âge du début des symptômes, les groupes musculaires atteints, le degré d'infiltration graisseuse et fibreuse au niveau des muscles

atteints, le degré d'inflammation, les niveaux sériques des CK, etc. suggèrent fortement que des facteurs environnementaux et/ou génétiques influencent le résultat des mutations. Parmi les facteurs environnementaux, nous pourrions spéculer que l'utilisation variable des muscles (selon le niveau d'activité physique) pourrait influencer la sévérité chez les anoctaminopathies 5. Ce facteur « mécanique » pourrait expliquer l'asymétrie observée chez un même individu, si celui-ci utilise ses membres plus d'un côté que de l'autre, selon qu'il soit droitier ou gaucher, par exemple. Cette question sera abordée à nouveau au **Chapitre 5.3**. Il est aussi difficile de spéculer sur des facteurs génétiques, puisque ceux-ci peuvent être très divers. Néanmoins, nous pourrions imaginer que si l'expression d'une autre Anoctamine est sur-régulée de façon à compenser la perte de l'Anoctamine 5, le degré de cette sur-régulation influencera certainement la progression et la sévérité de la dystrophie musculaire. D'autres modificateurs pourraient être des facteurs impliqués dans le métabolisme musculaire. En recherchant des facteurs génétiques influençant la perméabilité sarcolemmale et la fibrose chez deux modèles de souris porteuses homozygotes de la même mutation nulle de la γ -Sarcoglycane, dans deux fonds génétiques différents, Heydemann *et al.* a identifié un polymorphisme au gène *Ltbp4* (Latent transforming growth factor-binding protein 4), associé à une signalisation réduite par la TGF- β (transforming growth factor- β), à une réduction de la fibrose et par conséquent, à une pathologie atténuée [184].

De connaître la nature exacte et l'importance relative de chacun des facteurs modificateurs influençant la progression et la sévérité des anoctaminopathies 5 est essentiel pour plusieurs raisons. D'abord, il est important de connaître ces facteurs afin d'éventuellement rendre des pronostics justes aux patients qui se présenteront en clinique. Pour l'instant, la connaissance de la nature des mutations *ANO5* portées par un patient (identifiées par exemple par un test génétique) ne nous permet pas de prédire l'évolution de sa maladie. Ensuite, il sera pertinent de connaître les gènes modificateurs afin d'étudier ceux-ci comme des cibles thérapeutiques potentielles. La recherche d'agents pharmacologiques influençant

l'expression génique de ces gènes modificateurs, ou encore l'activité physiologique de la protéine en question, pourrait se traduire par l'élaboration de nouveaux traitements. Ces traitements seraient certainement applicables aux anoctaminopathies 5, mais également aux autres formes de dystrophies musculaires pour lesquelles le mécanisme pathophysiologique serait similaire à celui des anoctaminopathies 5.

Caractérisation de la LGMD2L et des LGMD au Québec

Il n'existe aucune donnée de prévalence pour les dystrophies musculaires des ceintures au Québec, ni même pour les dystrophies musculaires en général, sauf pour les dystrophies myotonique de Steinert [185, 186] et la dystrophie oculopharyngée [187], pas plus qu'il n'existe de registre des mutations dans notre population. Trois myopathies sont connues pour avoir des effets fondateurs dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean, soit la dystrophie myotonique de Steinert [186, 188], la myotonie congénitale [189] et une myasthénie congénitale due à des mutations au gène *DOK7* qui se manifeste dans notre population par une dystrophie musculaire des ceintures juvénile (**Annexe III**, [121]). Pourtant, la connaissance des sous-types et des mutations les plus fréquentes dans notre population serait utile pour diriger le clinicien vers un diagnostic accéléré.

Nous avons assemblé une imposante cohorte de 57 patients canadiens-français (38 familles) atteints de LGMD de type indéterminé. Il s'agit à notre connaissance de la plus importante collection d'ADN sur des cas de LGMD au Québec. Par séquençage des exons, de l'ADNc et de la région génomique d'*ANO5*, nous n'avons pu identifier plus de trois familles *ANO5*. Étant donné la haute probabilité d'hétérogénéité de la cohorte, le dépistage de mutations *ANO5* devrait être poursuivi uniquement sur les familles dont le potentiel d'identification de mutations *ANO5* est élevé, en se basant sur (1) les manifestations cliniques qui orientent vers un diagnostic *ANO5*, (2) l'exclusion de mutations *Dysferline* et *DOK7*, à cause des similitudes phénotypiques et (3) la liaison au chromosome 11p14.3-p15.1. Par exemple la

famille FC6 (**Tableau 3.2**), qui est liée au locus et dont l'atteint montre des CK élevés (1 851 U/L), une atrophie du quadriceps et une biopsie dystrophique, serait une bonne candidate chez qui d'autres approches de recherches mutationnelles pourraient être tentées, à la condition que des mutations *Dysferline* soient exclues chez ce patient. Les autres approches comprennent par exemple, l'analyse du nombre de copies (« copy-number variants », CNV), le séquençage de la région promotrice et l'analyse de l'expression d'*ANO5* (par qRT-PCR). Néanmoins, le fait demeure que la LGMD2L est un diagnostic à considérer dans notre population par le clinicien qui évalue des patients présentant une dystrophie musculaire des ceintures.

La recherche d'autres gènes mutés dans cette cohorte est limitée par la petitesse des familles (maximum d'un ou de deux individus atteints par famille, peu de fratries), ce qui réduit la puissance des analyses de liaison. La cartographie par homozygotie est utile pour identifier rapidement un locus d'intérêt pour les LGMD récessives [190], en particulier chez les familles consanguines et dans les populations à effet fondateur. Cependant, cette approche comporte des risques lorsque les parents des familles sont d'origines régionales variées, comme dans la majorité des cas de notre cohorte (**Tableau 3.2**). De plus, la variabilité interfamiliale rend plus difficile le regroupement des familles sous un même phénotype. L'approche par séquençage exomique (« exome sequencing ») pourrait s'avérer plus pertinente pour répondre à la question. Cette approche s'est avérée fructueuse pour identifier des gènes mutés pour des maladies récessives dans des petites familles [191], et elle est une avenue à explorer pour le diagnostic des LGMD [32].

5.2 Localisation et fonction d'*ANO5*

Une contribution importante de la découverte de mutations au gène *Anoctamine 5* associées à des dystrophies musculaires est d'avoir mis en lumière une nouvelle protéine essentielle

pour la biologie du muscle, ANO5, dont la localisation musculaire et la fonction sont pour l'instant encore à confirmer. ANO5 fait partie de la famille de protéines des Anoctamines qui compte 10 membres chez l'humain (ANO1-ANO10) et dont certains sont des canaux chlores activés par le calcium (CaCC).

La question à savoir si toutes les Anoctamines codent pour des CaCC demeure évasive [192-194]. Dans une étude d'électrophysiologie sur des cellules exprimant chaque Anoctamine de façon exogène, ANO5 n'a pas élicité de courant chlore [163]. Cependant, ANO5 n'était pas localisée de façon importante à la membrane, ce qui a limité son enregistrement. C'est également à cette conclusion que sont parvenus deux de nos collaborateurs, des électrophysiologistes d'expérience, qui ont tenté d'exprimer ANO5 à la surface de cellules avant de procéder à des enregistrements électrophysiologiques (« patch-clamp ») (Lucie Parent et Normand Leblanc, communications personnelles). À ce stade, nous ne possédons pas suffisamment d'éléments pour statuer sur la capacité d'ANO5 d'exprimer une conductance CaCC.

Une conductance CaCC n'a jamais été rapportée à la surface des cellules musculaires squelettiques, mais la forte conductance chlorique de CLCN1 (voltage-dépendant) peut avoir empêché la détection d'un courant CaCC [145]. Tel que mentionné au **Chapitre 4.2** (Discussion), un courant CaCC a déjà été enregistré dans le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique de lapin [147]. À la surface du muscle lisse vasculaire, ANO1 est responsable de la conductance CaCC [164], cette dernière contribuant au potentiel membranaire [195], et participant sous certaines conditions à la dépolarisation nécessaire pour la vasoconstriction (revu par [196]). D'autres myopathies sont dues à des défauts de canaux, entre autres une myasténie congénitale qui est due à des mutations dans un canal sodique, SCN4A [197], de même qu'une myopathie non-dystrophique, la myotonie congénitale qui est causée par des mutations à un canal chlorique, CLCN1 [198]. Dans ce

contexte, une fonction CaCC pour ANO5 pourrait être compatible avec un rôle dans le muscle squelettique, qu'il soit au sarcolemme ou dans un compartiment interne.

Le compte-rendu récent de la fonction d'ANO6 en tant que « scramblase » mérite de l'attention [165]. Cette étude a été la première à démontrer une fonction autre qu'une conductance ionique pour les ANO chez l'humain. D'un point de vue évolutif, ANO6 est l'Anoctamine la plus rapprochée d'ANO5 [160, 162] et ces deux protéines partagent 50,3% d'homologie [162]. Autre fait intéressant, ANO6 avait élicité *in vitro* une conductance chlore dans l'étude de Schreiber *et al.* [163], laissant suggérer que ces deux fonctions ne soient pas incompatibles l'une envers l'autre, du moins *in vitro*. Néanmoins, la seule protéine qui, à ce jour, est connue pour posséder une activité « scramblase » est ANO6 [199], par conséquent, nous possédons peu d'indices à savoir si ANO5 pourrait occuper une telle fonction.

Malgré qu'aucun des anticorps ANO5 n'ait été définitivement validé en raison du nombre de bandes reconnues, de la non-disponibilité de tissus déficients ou « knock-down » pour ANO5, et que par conséquent, les données générées à l'aide de ces anticorps demeurent préliminaires, nos études de localisation suggèrent qu'ANO5 joue un rôle dans un compartiment interne de la cellule. Dans nos études d'immunofluorescence, nous avons observé une co-localisation partielle d'ANO5 avec des marqueurs du réticulum sarcoplasmique et de la mitochondrie, deux organelles inter-reliées par une structure nommée les membranes associées aux mitochondries (MAMs) [177]. Qu'elle fonctionne comme CaCC, « scramblase » ou autre, ANO5 dans ses structures pourrait participer à l'homéostasie du calcium, incluant dans les mitochondries, ou au transport vésiculaire.

Directions futures

Afin d'élucider la fonction d'ANO5, il serait approprié de déterminer si cette Anoctamine adopte une structure en homodimère, comme le fait ANO1 [200, 201], ou encore si elle peut produire des hétérodimères en combinaison avec d'autres Anoctamines. Un système de transfection conjointe de deux constructions ANO possédant des étiquettes différentes pourrait être développé, et les protéines surexprimées pourraient être extraites selon différentes conditions (dénaturantes ou non) pour vérifier si des dimères peuvent être apparents sur immunoblots, ou si les deux ANO peuvent être immunoprécipitées simultanément. Dans l'éventualité où ANO5 serait identifiée dans un hétérodimère, son expression en combinaison avec sa partenaire ANO pourrait favoriser sa localisation à la membrane, ce qui, dans une étude d'électrophysiologie, contribuerait à déterminer sa capacité à éliciter un courant chlorique. Alternativement, les propriétés électrophysiologiques d'ANO5 pourraient être étudiées en extrayant des vésicules l'exprimant, et fusionnant celles-ci sur un système de bicouche lipidique (« lipid bilayer ») [202]. De la même façon, la localisation membranaire d'une ANO5 exogène pourrait permettre d'étudier ses propriétés « scramblase » et d'explorer si ANO5 peut porter cette fonction, dans un contexte *in vitro* du moins.

Plus globalement, l'identification des partenaires d'interaction d'ANO5 dans le muscle, en effectuant par exemple des immunoprécipitations des protéines complexées à ANO5 à partir de myotubes ou de tissu musculaire squelettique, puis en analysant les protéines par spectrométrie de masse, tel qu'il a été réalisé avec Dysferline [203], pourrait montrer les voies cellulaires dans lesquelles ANO5 est impliquée et révéler des indices quant à sa fonction.

Enfin, pour comprendre la fonction d'ANO5 dans le contexte du muscle squelettique, il serait pertinent d'établir sa localisation précise dans ce tissu, notamment par des études de

marquage immunologique en microscopie électronique (« immunogold »), ou encore par des immunoblots produits à partir de fractionnement de membranes.

5.3 ANO5 : un nouvel acteur des dystrophies musculaires

Plusieurs éléments penchent en faveur d'une implication d'Anoctamine 5 dans le processus de réparation membranaire qui se produit via la Dysferline. D'abord, la ressemblance phénotypique entre les dysferlinopathies (dont LGMD2B et MMD1 sont les principales formes alléliques) et les anoctaminopathies 5 (LGMD2L et MMD3) est considérable : dans les deux cas, des mutations au même gène (*Dysferline* et *Anoctamine 5*, respectivement) peuvent produire un phénotype de dystrophie musculaire proximale ou distale. Outre les LGMD2J (*Titine*) et LGMD2G (*Téléthonine*), les LGMD2B et 2L sont les deux seules autres formes de dystrophie musculaire proximale où il a été rapporté que des patients développaient éventuellement une faiblesse distale [9, 152, 157]. Parmi les autres aspects similaires entre LGMD2L et 2B, notons la bonne performance physique avant le début des symptômes [152], l'élévation des CK, qui est remarquable relativement aux autres sous-types de LGMD, de même que les trouvailles histologiques, telles que les multiples lésions focales du sarcolemme [119, 154, 157, 181]. Enfin, l'argument le plus éloquent est l'observation, chez les fibroblastes de deux patients MMD3, d'un défaut de réparation membranaire [136]. De façon analogue à l'expérience qui avait été réalisée chez les myotubes de souris déficientes en Dysferline [102], la cinétique de réparation membranaire chez les fibroblastes en culture de patients ANO5 a été mesurée suite à une irradiation laser en présence de fluorescents imperméables aux membranes. Cette expérience a mis en évidence que les cellules des patients, comparativement à celles du témoin, étaient plus lentes et moins efficaces à réparer les ruptures et que leur taux de réussite à la réparation était similaire à celui de l'échantillon témoin en absence de calcium [136]. Par ailleurs, les voies conventionnelles de réparation membranaire (via les lysosomes et les enlargeosomes)

ne semblaient pas affectées chez ces patients, tel que montré par la présence accrue du marqueur lysosomal LAMP1 et du marqueur enlargeosomal ANHAK à la surface des cellules après lésion [136].

L'hypothèse qui prévaut est que le défaut primaire des dysferlinopathies soit un défaut de réparation de la membrane [109, 204]. Suite à une rupture du sarcolemme, le recrutement et la fusion de vésicules au site de rupture seraient initiés pour colmater la fissure. La fusion des vésicules entre elles et avec le sarcolemme serait accomplie entre autres grâce à la Dysferline et sa capacité d'agir comme fusogène en réponse à l'augmentation locale de calcium. Il est d'ailleurs observé chez des patients déficients en Dysferline une accumulation de vésicules non-fusionnées sous-jacentes au site de rupture [40-42] (**Figure 5.1**). La nature et l'origine des vésicules qui transitent vers le site de rupture pour effectuer la réparation membranaire sont encore élusifs [151]. Les lysosomes [205] et les enlargeosomes [115] sont deux compartiments qui participent certainement à ce processus dans plusieurs types cellulaires, néanmoins, les voies alternatives utilisées par le muscle squelettique sont inconnues. Nous proposons un modèle où ANO5 réagirait à l'introduction de calcium qui se produit lors des lésions membranaires, soit en fonctionnant comme un canal chlore ou comme une scramblase, avec pour résultat de créer une surface de détachement à partir du compartiment membranaire où il est situé, qui pourrait être le réticulum sarcoplasmique (**Figure 5.2**). Ces vésicules ainsi créées, qu'elles incorporent ANO5 ou non, pourraient être transportées au site de rupture où la Dysferline favoriserait leur regroupement et leur fusion entre elles et avec la membrane. Cette hypothèse s'accorderait avec l'observation que chez les patients porteurs de mutations *ANO5*, nous n'observons pas d'accumulation de vésicules subsarcolemmales [119, 154, 157, 181] et impliquerait qu'*ANO5* intervienne en amont de la Dysferline dans le processus. De façon intéressante, chez la souris déficiente pour MG53, il a également été noté par microscopie électronique une absence de vésicules subsarcolemmales suite à des blessures [113]. MG53

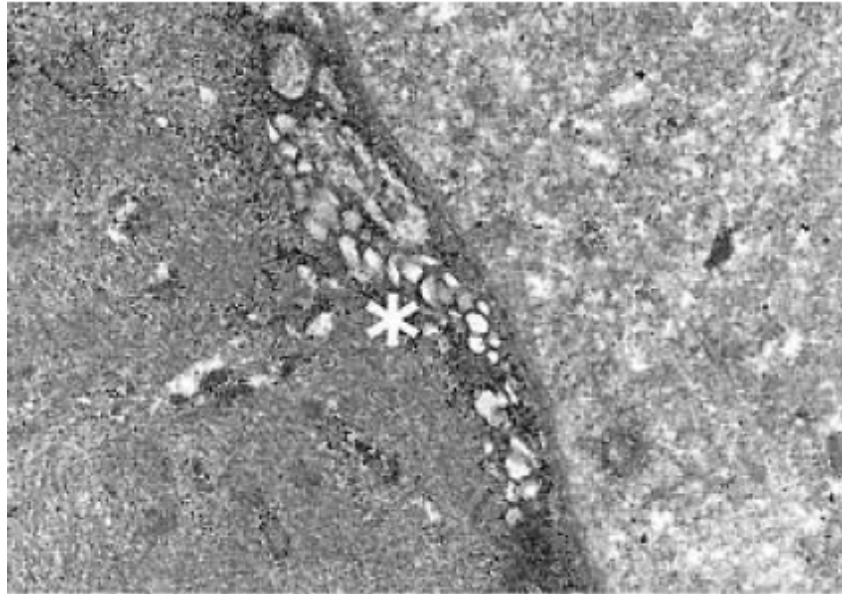
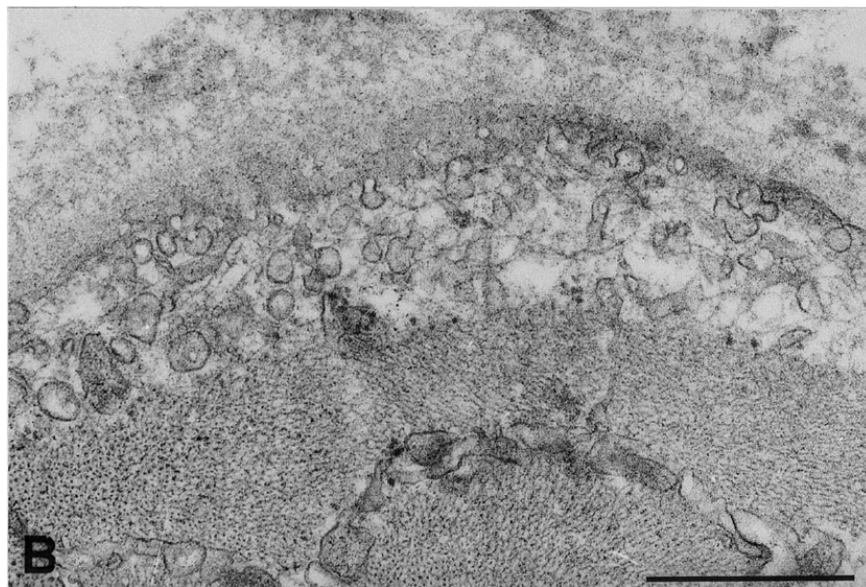
A**B**

Figure 5.1 Accumulation de vésicules subsarcolemmales chez des patients déficients pour la Dysferline

Tiré de Cenacchi et al., J Clin Pathol 2005 (A) et Selcen et al., Neurol 2001 (B)

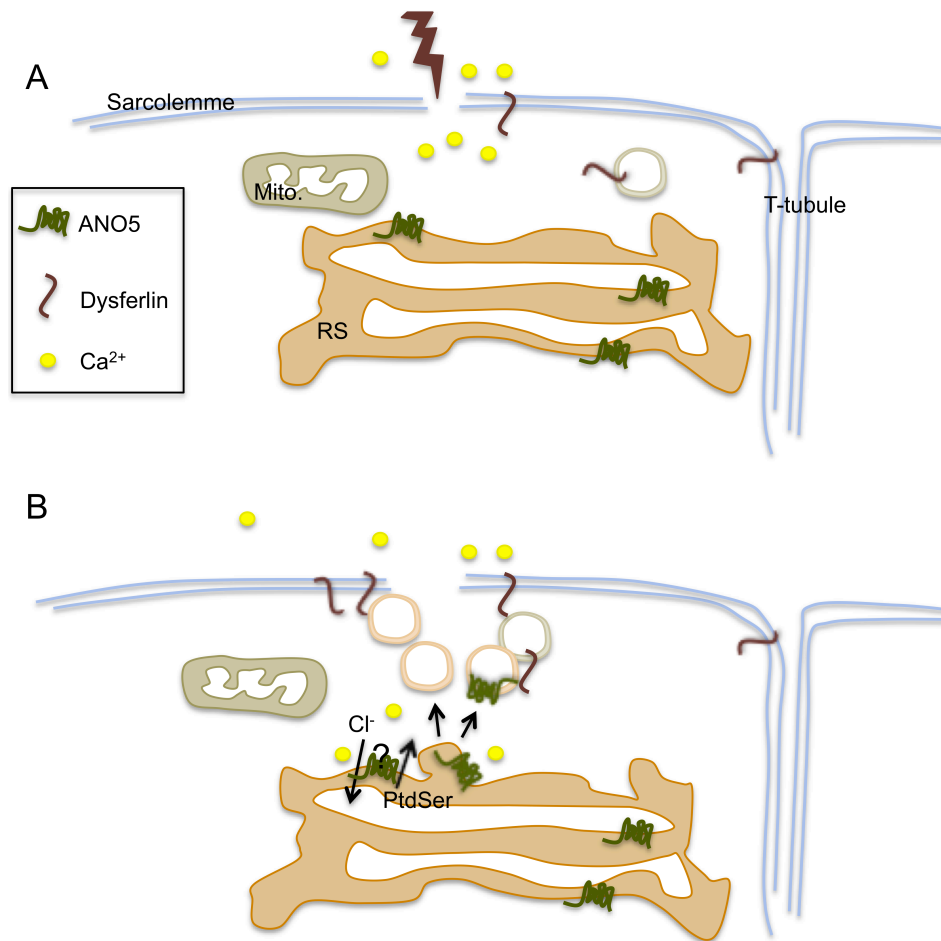


Figure 5.2 Modèle proposé pour le rôle d'ANO5 dans la réparation membranaire

(A) La rupture de la membrane suite à une lésion ferait augmenter la concentration de calcium autour du site de la lésion et pourrait activer localement des protéines dépendantes du calcium, telles ANO5 et la Dysferline, soit directement, soit via une signalisation.

(B) ANO5, en fonctionnant comme un canal chlore ou comme une « scramblase », pourrait créer une surface de détachement à partir du réticulum sarcoplasmique (RS) pour former des vésicules qui, en incorporant ANO5 ou non, seraient ciblées vers le site de la rupture. La Dysferline, présente au sarcolemme autour de la rupture, pourrait agir comme un fusogène pour promouvoir l'incorporation des vésicules recrutées à la membrane et ainsi colmater la fissure.

serait impliqué dans le recrutement et le trafic vésiculaire vers la membrane [112, 113]. Des mutations au gène *MG53* n'ont jamais été identifiées chez des patients ; par contre, la souris *mg53^{-/-}* développe un phénotype de dystrophie musculaire dans lequel la réparation membranaire est altérée [113]. Une interaction entre *MG53* et *ANO5* pourrait favoriser la formation des vésicules et déclencher leur recrutement vers la membrane, bien qu'à ce stade une telle interaction soit purement spéculative.

L'idée qu'*ANO5* jouerait un rôle dans le processus de réparation membranaire sous-tendrait que la nécrose prématurée des fibres musculaires serait corrélée avec leur degré d'utilisation et s'accorderait avec les faits que 1) l'asymétrie de la faiblesse et de l'atrophie pourrait être reflétée dans l'utilisation inégale que nous faisons de nos côtés droit et gauche, en fonction de notre tendance de droitier ou de gaucher, 2) les patients *ANO5* n'ont aucun problème de développement musculaire, puisque certains performant physiquement très bien dans leur jeunesse, et que par ailleurs, le patient le plus atteint de la famille FC9 (FC9-II:9) [157] était le plus actif de ses frères comme marathonnier durant sa jeunesse.

La question à savoir si la LGMD2L et la MMD3 sont causées par une perte de fonction complète ou partielle d'*ANO5* est toujours ouverte. Notre première hypothèse voulait que ces dystrophies musculaires soient causées par une perte de fonction complète et était appuyée par 1) la présence homozygote de deux mutations « nulles » chez au moins trois familles (familles FC29 et FC31 : c.1295C>Gspl, famille IV : c.191dupA) [157] et 2) l'augmentation marquée de la dégradation des ARNm porteurs de ces mutations qui laissait suggérer une absence de la protéine [157]. Ensuite, l'identification de nombreuses autres mutations, dont près de la moitié qui pourraient aussi être des mutations dites « nulles » (2 non-sens, 3 sites d'épissage, 4 duplications/insertions/délétions, **Chapitre 3.3**) laissait suggérer que chez ces patients également, la perte d'*ANO5* pourrait être complète. Il est à noter qu'aucun cas homozygote pour ces mutations n'a été rapporté, seulement des cas « compound heterozygotes » pour la mutation commune c.191dupA et une de ces mutations

récemment décrites. Compte tenu du haut niveau d'épissage alternatif d'ANO1 [167, 168] et d'ANO5 [137], nous avons vérifié si la mutation d'épissage c.1295C>G pouvait être compensée par des épissages alternatifs. Nos données ont montré qu'une certaine proportion des transcrits pouvaient conserver un cadre de lecture grâce au saut de l'exon 15 (**Chapitre 4**). La production chez ces patients d'une protéine ANO5 partiellement tronquée pourrait signifier que la pathogenèse de la LGMD2L résulte en fait d'une perte de fonction partielle, dans l'éventualité où il serait montré que cette protéine de plus faible poids moléculaire est réellement produite et qu'elle est partiellement fonctionnelle. Il serait intéressant d'étendre la caractérisation de l'épissage alternatif à d'autres mutations *ANO5*. S'il s'avère que quelques unes ou même la majorité de ces autres mutations puissent être compensées par des épissages alternatifs, le diagnostic des anoctaminopathies 5 par immunodétection utilisant des anticorps produits contre des épitopes N- et C-terminaux serait impossible.

Malgré ces incertitudes, ces résultats mériteraient d'être approfondis, afin de déterminer quel serait le phénotype associé à une perte complète d'ANO5, et ensuite, si une fonction partielle d'ANO5 est suffisante pour atténuer le phénotype de dystrophie musculaire chez ces malades. Dans cette éventualité, une avenue thérapeutique à explorer serait le saut d'exon (« exon skipping »), déjà à l'essai pour d'autres dystrophies musculaires [206] et qui fonctionne par l'introduction dans la cellule d'oligonucléotides anti-sens conçus pour cibler un exon précis afin de favoriser son exclusion, de rétablir le cadre de lecture et d'augmenter la production d'une protéine partiellement fonctionnelle. Dans le cas des patients porteurs de la mutation c.1295C>G, par exemple, chez qui la majorité des transcrits sont dégradés par le NMD, de favoriser l'exclusion de l'exon 15 sur une plus grande proportion de transcrits pourrait potentiellement atténuer leur phénotype.

La découverte d'un gène responsable d'une maladie est une expérience extraordinaire de recherche translationnelle où le travail de laboratoire conduit directement à des applications

cliniques. L'identification de mutations au gène *Anoctamine 5* fut non seulement une découverte qui facilitera le diagnostic et le conseil génétique pour des patients partout au monde, mais ouvre de plus la voie à l'étude d'une nouvelle classe de protéines importantes pour la biologie du muscle. L'hypothèse qu'ANO5 puisse être impliquée dans la réparation membranaire ouvre des pistes pour étudier ce processus et pour apprendre comment son dysfonctionnement progresse en des dystrophies musculaires.

Bibliographie

1. Walton, J.N., and Nattrass, F.J. (1954). On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 77, 169-231.
2. Bushby, K.M. (1995). Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscul Disord* 5, 71-74.
3. Emery, A.E. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* 359, 687-695.
4. Bushby, K.M., and Beckmann, J.S. (1995). The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 5, 337-343.
5. Angelini, C., Fanin, M., Freda, M.P., Duggan, D.J., Siciliano, G., and Hoffman, E.P. (1999). The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology* 52, 176-179.
6. Frosk, P., Greenberg, C.R., Tennese, A.A., Lamont, R., Nylen, E., Hirst, C., Frappier, D., Roslin, N.M., Zaik, M., Bushby, K., et al. (2005). The most common mutation in FKRP causing limb girdle muscular dystrophy type 2I (LGMD2I) may have occurred only once and is present in Hutterites and other populations. *Hum Mutat* 25, 38-44.
7. Takano, A., Bonnemann, C.G., Honda, H., Sakai, M., Feener, C.A., Kunkel, L.M., and Sobue, G. (2000). Intrafamilial phenotypic variation in limb-girdle muscular dystrophy type 2C with compound heterozygous mutations. *Muscle Nerve* 23, 807-810.
8. Angelini, C. (2004). Limb-girdle muscular dystrophies: heterogeneity of clinical phenotypes and pathogenetic mechanisms. *Acta Myol* 23, 130-136.
9. Guglieri, M., Straub, V., Bushby, K., and Lochmuller, H. (2008). Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr.Opin.Neurol.* 21, 576-584.
10. Schessl, J., Walter, M.C., Schreiber, G., Schara, U., Muller, C.R., Lochmuller, H., Bonnemann, C.G., Korinthenberg, R., and Kirschner, J. (2008). Phenotypic variability in siblings with calpainopathy (LGMD2A). *Acta Myol* 27, 54-58.
11. Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M.A., et al. (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 18, 365-368.
12. McNally, E.M., de Sa Moreira, E., Duggan, D.J., Bonnemann, C.G., Lisanti, M.P., Lidov, H.G., Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Hoffman, E.P., Zatz, M., et al. (1998). Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 7, 871-877.

13. Betz, R.C., Schoser, B.G., Kasper, D., Ricker, K., Ramirez, A., Stein, V., Torbergesen, T., Lee, Y.A., Nothen, M.M., Wienker, T.F., et al. (2001). Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat Genet* 28, 218-219.
14. Carbone, I., Bruno, C., Sotgia, F., Bado, M., Broda, P., Masetti, E., Panella, A., Zara, F., Bricarelli, F.D., Cordone, G., et al. (2000). Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* 54, 1373-1376.
15. Merlini, L., Carbone, I., Capanni, C., Sabatelli, P., Tortorelli, S., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Bruno, C., and Minetti, C. (2002). Familial isolated hyperCKaemia associated with a new mutation in the caveolin-3 (CAV-3) gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 65-67.
16. Alias, L., Gallano, P., Moreno, D., Pujol, R., Martinez-Matos, J.A., Baiget, M., Ferrer, I., and Olive, M. (2004). A novel mutation in the caveolin-3 gene causing familial isolated hyperCKaemia. *Neuromuscul Disord* 14, 321-324.
17. Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., et al. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat.Genet.* 20, 31-36.
18. Nguyen, K., Bassez, G., Krahn, M., Bernard, R., Laforet, P., Labelle, V., Urtizberea, J.A., Figarella-Branger, D., Romero, N., Attarian, S., et al. (2007). Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64, 1176-1182.
19. Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-Garcia, R., Palmer, J., Gallano, P., Baiget, M., Matsuda, C., and Brown, R.H. (2001). Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 49, 130-134.
20. Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A., et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21, 285-288.
21. Eriksson, M., Brown, W.T., Gordon, L.B., Glynn, M.W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M.R., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Berglund, P., et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298.
22. Saenz, A., Leturcq, F., Cobo, A.M., Poza, J.J., Ferrer, X., Otaegui, D., Camano, P., Urtasun, M., Vilchez, J., Gutierrez-Rivas, E., et al. (2005). LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain* 128, 732-742.

23. Klinge, L., Aboumoussa, A., Eagle, M., Hudson, J., Sarkozy, A., Vita, G., Charlton, R., Roberts, M., Straub, V., Barresi, R., et al. (2010). New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 946-953.
24. Godfrey, C., Clement, E., Mein, R., Brockington, M., Smith, J., Talim, B., Straub, V., Robb, S., Quinlivan, R., Feng, L., et al. (2007). Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain* 130, 2725-2735.
25. Weiler, T., Bashir, R., Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Britton, S., Nylen, E., Keers, S., Vafiadaki, E., Greenberg, C.R., et al. (1999). Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet* 8, 871-877.
26. Illarioshkin, S.N., Ivanova-Smolenskaya, I.A., Greenberg, C.R., Nylen, E., Sukhorukov, V.S., Poleshchuk, V.V., Markova, E.D., and Wrogemann, K. (2000). Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 55, 1931-1933.
27. Bejaoui, K., Liu, J., McKenna-Yasek, D., Le Paslier, D., Bossie, K., Gilligan, D.M., and Brown, R.H. (1998). Genetic fine mapping of the Miyoshi myopathy locus and exclusion of eight candidate genes. *Neurogenetics* 1, 189-196.
28. Bashir, R., Keers, S., Strachan, T., Passos-Bueno, R., Zatz, M., Weissenbach, J., Le Paslier, D., Meisler, M., and Bushby, K. (1996). Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. *Genomics* 33, 46-52.
29. Weiler, T., Greenberg, C.R., Nylen, E., Halliday, W., Morgan, K., Eggertson, D., and Wrogemann, K. (1996). Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype. *Am J Hum Genet* 59, 872-878.
30. Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., et al. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat.Genet.* 20, 37-42.
31. Bushby, K. (2009). Diagnosis and management of the limb girdle muscular dystrophies. *Pract Neurol* 9, 314-323.
32. Nigro, V., Aurino, S., and Piluso, G. (2011). Limb girdle muscular dystrophies: update on genetic diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol* 24, 429-436.

33. Amato, A.A., and Brown, R.H., Jr. (2011). Dysferlinopathies. *Handb Clin Neurol* 101, 111-118.
34. Paradas, C., Llauger, J., Diaz-Manera, J., Rojas-Garcia, R., De Luna, N., Iturriaga, C., Marquez, C., Uson, M., Hankiewicz, K., Gallardo, E., et al. (2010). Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology* 75, 316-323.
35. Bushby, K., and Straub, V. (2010). One gene, one or many diseases? Simplifying dysferlinopathy. *Neurology* 75, 298-299.
36. Rowin, J., Meriggioli, M.N., Cochran, E.J., and Sanders, D.B. (1999). Prominent inflammatory changes on muscle biopsy in patients with Miyoshi myopathy. *Neuromuscul Disord* 9, 417-420.
37. McNally, E.M., Ly, C.T., Rosenmann, H., Mitrani Rosenbaum, S., Jiang, W., Anderson, L.V., Soffer, D., and Argov, Z. (2000). Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. *Am J Med Genet* 91, 305-312.
38. Gallardo, E., Rojas-Garcia, R., de Luna, N., Pou, A., Brown, R.H., Jr., and Illa, I. (2001). Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 57, 2136-2138.
39. Confalonieri, P., Oliva, L., Andreetta, F., Lorenzoni, R., Dassi, P., Mariani, E., Morandi, L., Mora, M., Cornelio, F., and Mantegazza, R. (2003). Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study. *J Neuroimmunol* 142, 130-136.
40. Selcen, D., Stilling, G., and Engel, A.G. (2001). The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* 56, 1472-1481.
41. Piccolo, F., Moore, S.A., Ford, G.C., and Campbell, K.P. (2000). Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 48, 902-912.
42. Cenacchi, G., Fanin, M., De Giorgi, L.B., and Angelini, C. (2005). Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J.Clin.Pathol.* 58, 190-195.
43. Gayathri, N., Alefia, R., Nalini, A., Yasha, T.C., Anita, M., Santosh, V., and Shankar, S.K. (2011). Dysferlinopathy: spectrum of pathological changes in skeletal muscle tissue. *Indian J Pathol Microbiol* 54, 350-354.
44. Norwood, F., de, V.M., Eymard, B., Lochmuller, H., and Bushby, K. (2007). EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur.J.Neurol.* 14, 1305-1312.

45. Barresi, R. (2011). From proteins to genes: immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. *Skelet Muscle* 1, 24.
46. Vainzof, M., Passos-Bueno, M.R., Canovas, M., Moreira, E.S., Pavanello, R.C., Marie, S.K., Anderson, L.V., Bonnemann, C.G., McNally, E.M., Nigro, V., et al. (1996). The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum.Mol.Genet.* 5, 1963-1969.
47. Anderson, L.V., Harrison, R.M., Pogue, R., Vafiadaki, E., Pollitt, C., Davison, K., Moss, J.A., Keers, S., Pyle, A., Shaw, P.J., et al. (2000). Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 10, 553-559.
48. Haravuori, H., Vihola, A., Straub, V., Auranen, M., Richard, I., Marchand, S., Voit, T., Labeit, S., Somer, H., Peltonen, L., et al. (2001). Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology* 56, 869-877.
49. Lo, H.P., Cooper, S.T., Evesson, F.J., Seto, J.T., Chiotis, M., Tay, V., Compton, A.G., Cairns, A.G., Corbett, A., MacArthur, D.G., et al. (2008). Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscul.Disord.* 18, 34-44.
50. Norwood, F.L., Harling, C., Chinnery, P.F., Eagle, M., Bushby, K., and Straub, V. (2009). Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain* 132, 3175-3186.
51. van der Kooi, A.J., Frankhuizen, W.S., Barth, P.G., Howeler, C.J., Padberg, G.W., Spaans, F., Wintzen, A.R., Wokke, J.H., van Ommen, G.J., de Visser, M., et al. (2007). Limb-girdle muscular dystrophy in the Netherlands: gene defect identified in half the families. *Neurology* 68, 2125-2128.
52. Guglieri, M., Magri, F., D'Angelo, M.G., Prella, A., Morandi, L., Rodolico, C., Cagliani, R., Mora, M., Fortunato, F., Bordini, A., et al. (2008). Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum.Mutat.* 29, 258-266.
53. Fanin, M., Nascimbeni, A.C., Aurino, S., Tasca, E., Pegoraro, E., Nigro, V., and Angelini, C. (2009). Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology* 72, 1432-1435.
54. Moore, S.A., Shilling, C.J., Westra, S., Wall, C., Wicklund, M.P., Stolle, C., Brown, C.A., Michele, D.E., Piccolo, F., Winder, T.L., et al. (2006). Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 995-1003.

55. Sveen, M.L., Schwartz, M., and Vissing, J. (2006). High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol* 59, 808-815.
56. Straub, V., and Campbell, K.P. (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10, 168-175.
57. Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122, 809-823.
58. Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J.S., and Campbell, K.P. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 270, 27305-27310.
59. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355, 696-702.
60. Crosbie, R.H., Heighway, J., Venzke, D.P., Lee, J.C., and Campbell, K.P. (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272, 31221-31224.
61. Ervasti, J.M., and Campbell, K.P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66, 1121-1131.
62. Grady, R.M., Grange, R.W., Lau, K.S., Maimone, M.M., Nichol, M.C., Stull, J.T., and Sanes, J.R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol* 1, 215-220.
63. Yoshida, M., Hama, H., Ishikawa-Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S., Sasaoka, T., and Ozawa, E. (2000). Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* 9, 1033-1040.
64. Yang, B., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A., and Campbell, K.P. (1994). Heterogeneity of the 59-kDa dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning and expression. *J Biol Chem* 269, 6040-6044.
65. Vainzof, M., and Bushby, K. (2010). Muscular dystrophies presenting with proximal muscle weakness. In *Disorders of voluntary muscle*, 8th Edition, G. Karpati, D. Hilton-Jones, K. Bushby and R.C. Griggs, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 230-256.
66. Henry, M.D., and Campbell, K.P. (1996). Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8, 625-631.

67. Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3710-3714.
68. Williams, M.W., and Bloch, R.J. (1999). Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* *20*, 383-393.
69. Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., et al. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* *84*, 757-767.
70. Rybakova, I.N., Patel, J.R., and Ervasti, J.M. (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* *150*, 1209-1214.
71. Barton, E.R. (2006). Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* *290*, C411-419.
72. Michele, D.E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R.D., Satz, J.S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R.I., Somer, H., et al. (2002). Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* *418*, 417-422.
73. Barresi, R., and Campbell, K.P. (2006). Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* *119*, 199-207.
74. Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., et al. (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* *69*, 1198-1209.
75. Balci, B., Uyanik, G., Dincer, P., Gross, C., Willer, T., Talim, B., Haliloglu, G., Kale, G., Hehr, U., Winkler, J., et al. (2005). An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord* *15*, 271-275.
76. Godfrey, C., Escolar, D., Brockington, M., Clement, E.M., Mein, R., Jimenez-Mallebrera, C., Torelli, S., Feng, L., Brown, S.C., Sewry, C.A., et al. (2006). Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol* *60*, 603-610.
77. Clement, E.M., Godfrey, C., Tan, J., Brockington, M., Torelli, S., Feng, L., Brown, S.C., Jimenez-Mallebrera, C., Sewry, C.A., Longman, C., et al. (2008). Mild

- POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch Neurol* 65, 137-141.
78. Brockington, M., Blake, D.J., Brown, S.C., and Muntoni, F. (2002). The gene for a novel glycosyltransferase is mutated in congenital muscular dystrophy MDC1C and limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord* 12, 233-234.
 79. Lin, Y.C., Murakami, T., Hayashi, Y.K., Nishino, I., Nonaka, I., Yuo, C.Y., and Jong, Y.J. (2007). A novel FKRP gene mutation in a Taiwanese patient with limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Brain Dev* 29, 234-238.
 80. Brown, S.C., Torelli, S., Brockington, M., Yuva, Y., Jimenez, C., Feng, L., Anderson, L., Ugo, I., Kroger, S., Bushby, K., et al. (2004). Abnormalities in alpha-dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol* 164, 727-737.
 81. Kim, D.S., Hayashi, Y.K., Matsumoto, H., Ogawa, M., Noguchi, S., Murakami, N., Sakuta, R., Mochizuki, M., Michele, D.E., Campbell, K.P., et al. (2004). POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology* 62, 1009-1011.
 82. Hara, Y., Balci-Hayta, B., Yoshida-Moriguchi, T., Kanagawa, M., Beltran-Valero de Bernabe, D., Gundesli, H., Willer, T., Satz, J.S., Crawford, R.W., Burden, S.J., et al. (2011). A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N Engl J Med* 364, 939-946.
 83. Hack, A.A., Groh, M.E., and McNally, E.M. (2000). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* 48, 167-180.
 84. Holt, K.H., and Campbell, K.P. (1998). Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 273, 34667-34670.
 85. Thompson, T.G., Chan, Y.M., Hack, A.A., Brosius, M., Rajala, M., Lidov, H.G., McNally, E.M., Watkins, S., and Kunkel, L.M. (2000). Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* 148, 115-126.
 86. Yoshida, T., Pan, Y., Hanada, H., Iwata, Y., and Shigekawa, M. (1998). Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* 273, 1583-1590.
 87. Bonnemann, C.G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., McNally, E.M., Duggan, D.J., Angelini, C., and Hoffman, E.P. (1995). Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat.Genet.* 11, 266-273.
 88. Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H., et al.

- (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270, 819-822.
89. Roberds, S.L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D., Lim, L.E., Lee, J.C., Tome, F.M., Romero, N.B., et al. (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78, 625-633.
 90. Lim, L.E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C., Slaughter, C., et al. (1995). Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 11, 257-265.
 91. Hack, A.A., Cordier, L., Shoturma, D.I., Lam, M.Y., Sweeney, H.L., and McNally, E.M. (1999). Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 10723-10728.
 92. Durbeej, M., Cohn, R.D., Hrstka, R.F., Moore, S.A., Allamand, V., Davidson, B.L., Williamson, R.A., and Campbell, K.P. (2000). Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 5, 141-151.
 93. Guglieri, M., Magri, F., and Comi, G.P. (2005). Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities. *Clin Chim Acta* 361, 54-79.
 94. Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E., and Podolsky, R.J. (1986). A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* 323, 160-164.
 95. Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., De Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I., et al. (2002). Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet* 71, 492-500.
 96. Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M.R., et al. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* 24, 163-166.
 97. Hauser, M.A., Horrigan, S.K., Salmikangas, P., Torian, U.M., Viles, K.D., Dancel, R., Tim, R.W., Taivainen, A., Bartoloni, L., Gilchrist, J.M., et al. (2000). Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet* 9, 2141-2147.
 98. Steinhardt, R.A., Bi, G., and Alderton, J.M. (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 263, 390-393.
 99. Bi, G.Q., Alderton, J.M., and Steinhardt, R.A. (1995). Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *J Cell Biol* 131, 1747-1758.

100. Terasaki, M., Miyake, K., and McNeil, P.L. (1997). Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca^{2+} -dependent vesicle-vesicle fusion events. *J Cell Biol* 139, 63-74.
101. McNeil, P.L., Miyake, K., and Vogel, S.S. (2003). The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4592-4597.
102. Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.C., Williamson, R., McNeil, P.L., and Campbell, K.P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423, 168-172.
103. Lennon, N.J., Kho, A., Bacskai, B.J., Perlmutter, S.L., Hyman, B.T., and Brown, R.H., Jr. (2003). Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J.Biol.Chem.* 278, 50466-50473.
104. Achanzar, W.E., and Ward, S. (1997). A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci* 110 (Pt 9), 1073-1081.
105. Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Young, C., Cullen, M.J., Walsh, J., Johnson, M.A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., et al. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 8, 855-861.
106. Klinge, L., Laval, S., Keers, S., Haldane, F., Straub, V., Barresi, R., and Bushby, K. (2007). From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J.* 21, 1768-1776.
107. Roche, J.A., Lovering, R.M., and Bloch, R.J. (2008). Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury in vivo. *Neuroreport* 19, 1579-1584.
108. Davis, D.B., Doherty, K.R., Delmonte, A.J., and McNally, E.M. (2002). Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem* 277, 22883-22888.
109. Glover, L., and Brown, R.H., Jr. (2007). Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic.* 8, 785-794.
110. Han, R., and Campbell, K.P. (2007). Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19, 409-416.
111. McNeil, A.K., Rescher, U., Gerke, V., and McNeil, P.L. (2006). Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J.Biol.Chem.* 281, 35202-35207.
112. Cai, C., Weisleder, N., Ko, J.K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., and Ma, J. (2009). Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J.Biol.Chem.* 284, 15894-15902.

113. Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J.K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., et al. (2009). MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat.Cell Biol.* *11*, 56-64.
114. Benaud, C., Gentil, B.J., Assard, N., Court, M., Garin, J., Delphin, C., and Baudier, J. (2004). AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol* *164*, 133-144.
115. Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Rupnik, M., and Meldolesi, J. (2004). Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route. *Mol Biol Cell* *15*, 5356-5368.
116. Huang, Y., Laval, S.H., van, R.A., Baudier, J., Benaud, C., Anderson, L.V., Straub, V., Deelder, A., Frants, R.R., den Dunnen, J.T., et al. (2007). AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* *21*, 732-742.
117. Huang, Y., Verheesen, P., Roussis, A., Frankhuizen, W., Ginjaar, I., Haldane, F., Laval, S., Anderson, L.V., Verrips, T., Frants, R.R., et al. (2005). Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet* *13*, 721-730.
118. Huang, Y., de Morree, A., van Remoortere, A., Bushby, K., Frants, R.R., Dunnen, J.T., and van der Maarel, S.M. (2008). Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* *17*, 1855-1866.
119. Jarry, J., Rioux, M.F., Bolduc, V., Robitaille, Y., Khoury, V., Thiffault, I., Tetreault, M., Loisel, L., Bouchard, J.P., and Brais, B. (2007). A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain* *130*, 368-380.
120. Carr, I.M., Flintoff, K.J., Taylor, G.R., Markham, A.F., and Bonthron, D.T. (2006). Interactive visual analysis of SNP data for rapid autozygosity mapping in consanguineous families. *Hum.Mutat.* *27*, 1041-1046.
121. Srour, M., Bolduc, V., Guergueltcheva, V., Lochmuller, H., Gendron, D., Shevell, M.I., Poulin, C., Mathieu, J., Bouchard, J.P., and Brais, B. (2010). DOK7 mutations presenting as a proximal myopathy in French Canadians. *Neuromuscul Disord* *20*, 453-457.
122. Boyden, S.E., Salih, M.A., Duncan, A.R., White, A.J., Estrella, E.A., Burgess, S.L., Seidahmed, M.Z., Al-Jarallah, A.S., Alkhalidi, H.M., Al-Maneea, W.M., et al. (2010). Efficient identification of novel mutations in patients with limb girdle muscular dystrophy. *Neurogenetics* *11*, 449-455.
123. Cohn, R.D., and Campbell, K.P. (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* *23*, 1456-1471.

124. Allikian, M.J., and McNally, E.M. (2007). Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*. 8, 177-183.
125. Malicdan, M.C., and Nonaka, I. (2008). Distal myopathies a review: highlights on distal myopathies with rimmed vacuoles. *Neurol.India* 56, 314-324.
126. Urtizberea, J.A., Bassez, G., Leturcq, F., Nguyen, K., Krahm, M., and Levy, N. (2008). Dysferlinopathies. *Neurol.India* 56, 289-297.
127. Galindo, B.E., and Vacquier, V.D. (2005). Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer. *Int.J.Mol.Med.* 16, 919-924.
128. Hartzell, H.C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L.T., and Qu, Z. (2009). Anoctamin/TMEM16 family members are Ca^{2+} -activated Cl^- channels. *J.Physiol* 587, 2127-2139.
129. Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeiffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., and Galletta, L.J. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590-594.
130. Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134, 1019-1029.
131. Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.M., et al. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210-1215.
132. Stohr, H., Heisig, J.B., Benz, P.M., Schoberl, S., Milenkovic, V.M., Strauss, O., Aartsen, W.M., Wijnholds, J., Weber, B.H., and Schulz, H.L. (2009). TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals. *J.Neurosci.* 29, 6809-6818.
133. Stephan, A.B., Shum, E.Y., Hirsh, S., Cygnar, K.D., Reiser, J., and Zhao, H. (2009). ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 11776-11781.
134. Almaca, J., Tian, Y., Aldehni, F., Ousingsawat, J., Kongsuphol, P., Rock, J.R., Harfe, B.D., Schreiber, R., and Kunzelmann, K. (2009). TMEM16 proteins produce volume regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A. *J.Biol.Chem.*
135. Linssen, W.H., de Visser, M., Notermans, N.C., Vreyling, J.P., Van Doorn, P.A., Wokke, J.H., Baas, F., and Bolhuis, P.A. (1998). Genetic heterogeneity in Miyoshi-type distal muscular dystrophy. *Neuromuscul.Disord.* 8, 317-320.
136. Jaiswal, J.K., Marlow, G., Summerill, G., Mahjneh, I., Mueller, S., Hill, M., Miyake, K., Haase, H., Anderson, L.V., Richard, I., et al. (2007). Patients with a

- non-dysferlin Miyoshi myopathy have a novel membrane repair defect. *Traffic*. 8, 77-88.
137. Tsutsumi, S., Inoue, H., Sakamoto, Y., Mizuta, K., Kamata, N., and Itakura, M. (2005). Molecular cloning and characterization of the murine gnathodiaphyseal dysplasia gene GDD1. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 331, 1099-1106.
 138. Brogna, S., and Wen, J. (2009). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 16, 107-113.
 139. Hellemans, J., Mortier, G., De, P.A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
 140. Tsutsumi, S., Kamata, N., Vokes, T.J., Maruoka, Y., Nakakuki, K., Enomoto, S., Omura, K., Amagasa, T., Nagayama, M., Saito-Ohara, F., et al. (2004). The novel gene encoding a putative transmembrane protein is mutated in gnathodiaphyseal dysplasia (GDD). *Am.J.Hum.Genet.* 74, 1255-1261.
 141. Mizuta, K., Tsutsumi, S., Inoue, H., Sakamoto, Y., Miyatake, K., Miyawaki, K., Noji, S., Kamata, N., and Itakura, M. (2007). Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 357, 126-132.
 142. Rock, J.R., and Harfe, B.D. (2008). Expression of TMEM16 paralogs during murine embryogenesis. *Dev.Dyn.* 237, 2566-2574.
 143. Ousingsawat, J., Martins, J.R., Schreiber, R., Rock, J.R., Harfe, B.D., and Kunzelmann, K. (2009). Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J.Biol.Chem.*
 144. Rock, J.R., O'Neal, W.K., Gabriel, S.E., Randell, S.H., Harfe, B.D., Boucher, R.C., and Grubb, B.R. (2009). Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways. *J.Biol.Chem.* 284, 14875-14880.
 145. Hartzell, C., Putzier, I., and Arreola, J. (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annu.Rev.Physiol* 67, 719-758.
 146. Aromataris, E.C., and Rychkov, G.Y. (2006). ClC-1 chloride channel: Matching its properties to a role in skeletal muscle. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 33, 1118-1123.
 147. Kourie, J.I., Laver, D.R., Ahern, G.P., and Dulhunty, A.F. (1996). A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 270, C1675-C1686.
 148. Fein, A., and Terasaki, M. (2005). Rapid increase in plasma membrane chloride permeability during wound resealing in starfish oocytes. *J.Gen.Physiol* 126, 151-159.

149. Ampong, B.N., Imamura, M., Matsumiya, T., Yoshida, M., and Takeda, S. (2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol.* 24, 134-144.
150. Hernandez-Deviez, D.J., Howes, M.T., Laval, S.H., Bushby, K., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2008). Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *J.Biol.Chem.* 283, 6476-6488.
151. McNeil, P.L., and Kirchhausen, T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6, 499-505.
152. Hicks, D., Sarkozy, A., Muelas, N., Koehler, K., Huebner, A., Hudson, G., Chinnery, P.F., Barresi, R., Eagle, M., Polvikoski, T., et al. (2011). A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. *Brain* 134, 171-182.
153. Milone, M., Liewluck, T., Winder, T.L., and Pianosi, P.T. (2011). Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.*
154. Deschauer, M., Joshi, P.R., Glaser, D., Hanisch, F., Stoltenburg, G., and Zierz, S. (2011). [Muscular dystrophy due to mutations in anoctamin 5 : Clinical and molecular genetic findings.]. *Nervenarzt.*
155. Penttila, S., Raheem, O., Suominen, T., Hackman, P., and Udd, B. (2010). Occurrence of ANO5 mutation R758C in patients with a muscular dystrophy of unknown etiology. In 15th International Congress of the World Muscle Society, Volume 20, N. Disorders, ed. (Kumamoto, Japan: Elsevier), p. 608.
156. Leturcq, F., Cossée, M., Deburgrave, N., Orhant, L., Kaplan, J.C., Stojkovic, T., Laforet, P., Behin, A., and Eymard, B. (2011). Pathology of Anoctamin 5 : more alleles, more phenotypes. In *Myology 2011*. (Lille Grand Palais, France).
157. Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K.M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., Itakura, M., Robitaille, Y., Parent, L., Baas, F., et al. (2010). Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am J Hum Genet* 86, 213-221.
158. Stankiewicz, P., and Lupski, J.R. (2010). Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 61, 437-455.
159. Sriver, C.R. (2001). Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, 69-101.
160. Milenkovic, V.M., Brockmann, M., Stohr, H., Weber, B.H., and Strauss, O. (2010). Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins. *BMC Evol Biol* 10, 319.

161. Katoh, M. (2004). GDD1 is identical to TMEM16E, a member of the TMEM16 family. *Am.J.Hum.Genet.* 75, 927-928.
162. Katoh, M. (2004). Identification and characterization of TMEM16E and TMEM16F genes in silico. *Int.J.Oncol.* 24, 1345-1349.
163. Schreiber, R., Uliyakina, I., Kongsuphol, P., Warth, R., Mirza, M., Martins, J.R., and Kunzelmann, K. (2010). Expression and function of epithelial anoctamins. *J Biol Chem* 285, 7838-7845.
164. Manoury, B., Tamuleviciute, A., and Tammaro, P. (2010). TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 588, 2305-2314.
165. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834-838.
166. Wallace, G.Q., and McNally, E.M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71, 37-57.
167. Ferrera, L., Caputo, A., Ubby, I., Bussani, E., Zegarra-Moran, O., Ravazzolo, R., Pagani, F., and Galietta, L.J. (2009). Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *J Biol Chem* 284, 33360-33368.
168. O'Driscoll, K.E., Pipe, R.A., and Britton, F.C. (2011). Increased complexity of Tmem16a/Anoctamin 1 transcript alternative splicing. *BMC Mol Biol* 12, 35.
169. Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V., and Sorrentino, V. (2008). The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* 9, 1044-1049.
170. Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 8, 749-761.
171. Dogan, R.I., Getoor, L., Wilbur, W.J., and Mount, S.M. (2007). SplicePort--an interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Res* 35, W285-291.
172. Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M., and Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37, e67.
173. McGlincy, N.J., and Smith, C.W. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* 33, 385-393.
174. Kramer, J., and Hawley, R.S. (2003). The spindle-associated transmembrane protein Axs identifies a new family of transmembrane proteins in eukaryotes. *Cell Cycle* 2, 174-176.

175. Kramer, J., and Hawley, R.S. (2003). The spindle-associated transmembrane protein Axs identifies a membranous structure ensheathing the meiotic spindle. *Nat Cell Biol* 5, 261-263.
176. Reeves, W.B., and Gurich, R.W. (1994). Calcium-dependent chloride channels in endosomes from rabbit kidney cortex. *Am J Physiol* 266, C741-750.
177. Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., and Su, T.P. (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19, 81-88.
178. Spuler, S., Carl, M., Zabojszcza, J., Straub, V., Bushby, K., Moore, S.A., Bähring, S., Wenzel, K., Vinkemeier, U., and Rocken, C. (2008). Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol* 63, 323-328.
179. Rosales, X.Q., Gastier-Foster, J.M., Lewis, S., Vinod, M., Thrush, D.L., Astbury, C., Pyatt, R., Reshmi, S., Sahenk, Z., and Mendell, J.R. (2010). Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve* 42, 14-21.
180. Linssen, W.H., Notermans, N.C., Van der Graaf, Y., Wokke, J.H., Van Doorn, P.A., Howeler, C.J., Busch, H.F., De Jager, A.E., and De Visser, M. (1997). Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain* 120 (Pt 11), 1989-1996.
181. Mahjneh, I., Jaiswal, J., Lamminen, A., Somer, M., Marlow, G., Kiuru-Enari, S., and Bashir, R. (2010). A new distal myopathy with mutation in anoctamin 5. *Neuromuscul Disord* 20, 791-795.
182. Kefi, M., Amouri, R., Driss, A., Ben Hamida, C., Ben Hamida, M., Kunkel, L.M., and Hentati, F. (2003). Phenotype and sarcoglycan expression in Tunisian LGMD 2C patients sharing the same del521-T mutation. *Neuromuscul Disord* 13, 779-787.
183. McNally, E.M., Passos-Bueno, M.R., Bonnemann, C.G., Vainzof, M., de Sa Moreira, E., Lidov, H.G., Othmane, K.B., Denton, P.H., Vance, J.M., Zatz, M., et al. (1996). Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 59, 1040-1047.
184. Heydemann, A., Ceco, E., Lim, J.E., Hadhazy, M., Ryder, P., Moran, J.L., Beier, D.R., Palmer, A.A., and McNally, E.M. (2009). Latent TGF-beta-binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest* 119, 3703-3712.
185. Bouchard, G., Roy, R., Declos, M., Mathieu, J., and Kouladjian, K. (1989). Origin and diffusion of the myotonic dystrophy gene in the Saguenay region (Quebec). *Can J Neurol Sci* 16, 119-122.
186. Mathieu, J., De Braekeleer, M., and Prevost, C. (1990). Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada). *Neurology* 40, 839-842.

187. Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rochefort, D.L., Chretien, N., Tome, F.M., Lafreniere, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O., et al. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18, 164-167.
188. Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J.F., Bourgeois, S., Lemieux-Blanchard, E., Labuda, M., Vezina, H., et al. (2005). Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet* 117, 177-187.
189. Rossignol, E., Mathieu, J., Thiffault, I., Tetreault, M., Dicaire, M.J., Chrestian, N., Dupre, N., Puymirat, J., and Brais, B. (2007). A novel founder SCN4A mutation causes painful cold-induced myotonia in French-Canadians. *Neurology* 69, 1937-1941.
190. Papic, L., Fischer, D., Trajanoski, S., Hoftberger, R., Fischer, C., Strobel, T., Schmidt, W.M., Bittner, R.E., Schabhuettl, M., Gruber, K., et al. (2011). SNP-array based whole genome homozygosity mapping: a quick and powerful tool to achieve an accurate diagnosis in LGMD2 patients. *Eur J Med Genet* 54, 214-219.
191. Pierce, S.B., Walsh, T., Chisholm, K.M., Lee, M.K., Thornton, A.M., Fiumara, A., Opitz, J.M., Levy-Lahad, E., Klevit, R.E., and King, M.C. (2010). Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault Syndrome. *Am J Hum Genet* 87, 282-288.
192. Flores, C.A., Cid, L.P., Sepulveda, F.V., and Niemeyer, M.I. (2009). TMEM16 proteins: the long awaited calcium-activated chloride channels? *Braz J Med Biol Res* 42, 993-1001.
193. Galiotta, L.J. (2009). The TMEM16 protein family: a new class of chloride channels? *Biophys J* 97, 3047-3053.
194. Duran, C., and Hartzell, H.C. (2011). Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin* 32, 685-692.
195. Forrest, A.S., Angermann, J.E., Raghunathan, R., Lachendro, C., Greenwood, I.A., and Leblanc, N. (2010). Intricate interaction between store-operated calcium entry and calcium-activated chloride channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 661, 31-55.
196. Leblanc, N., Ledoux, J., Saleh, S., Sanguinetti, A., Angermann, J., O'Driscoll, K., Britton, F., Perrino, B.A., and Greenwood, I.A. (2005). Regulation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle cells: a complex picture is emerging. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 541-556.

197. Tsujino, A., Maertens, C., Ohno, K., Shen, X.M., Fukuda, T., Harper, C.M., Cannon, S.C., and Engel, A.G. (2003). Myasthenic syndrome caused by mutation of the SCN4A sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7377-7382.
198. George, A.L., Jr., Crackower, M.A., Abdalla, J.A., Hudson, A.J., and Ebers, G.C. (1993). Molecular basis of Thomsen's disease (autosomal dominant myotonia congenita). *Nat Genet* *3*, 305-310.
199. Lhermusier, T., Chap, H., and Payrastre, B. (2011). Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* *9*, 1883-1891.
200. Fallah, G., Romer, T., Detro-Dassen, S., Braam, U., Markwardt, F., and Schmalzing, G. (2011). TMEM16A(a)/anoctamin-1 shares a homodimeric architecture with CLC chloride channels. *Mol Cell Proteomics* *10*, M110 004697.
201. Sheridan, J.T., Worthington, E.N., Yu, K., Gabriel, S.E., Hartzell, H.C., and Tarran, R. (2011). Characterization of the oligomeric structure of the Ca(2+)-activated Cl-channel Ano1/TMEM16A. *J Biol Chem* *286*, 1381-1388.
202. Sheppard, D.N., Gray, M.A., Gong, X., Sohma, Y., Kogan, I., Benos, D.J., Scott-Ward, T.S., Chen, J.H., Li, H., Cai, Z., et al. (2004). The patch-clamp and planar lipid bilayer techniques: powerful and versatile tools to investigate the CFTR Cl-channel. *J Cyst Fibros* *3 Suppl 2*, 101-108.
203. de Morree, A., Hensbergen, P.J., van Haagen, H.H., Dragan, I., Deelder, A.M., t Hoen, P.A., Frants, R.R., and van der Maarel, S.M. (2010). Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity. *PLoS One* *5*, e13854.
204. Bansal, D., and Campbell, K.P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* *14*, 206-213.
205. Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* *106*, 157-169.
206. Muntoni, F., and Wood, M.J. (2011). Targeting RNA to treat neuromuscular disease. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 621-637.

Annexe I. Curriculum vitae

EDUCATION

2006-	Ph.D. Molecular Biology	Université de Montréal, Montréal, Canada
2004-2006	M.Sc. Molecular Biology	Université de Montréal, Montréal, Canada
1998-2001	B.Sc. Biology (biotechnology)	Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

WORK EXPERIENCE

2006-	Ph.D. candidate, Laboratory of Dr. Bernard Brais Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada Thesis title: <i>Identification of Anoctamin 5 mutations responsible for a new form of recessive limb-girdle muscular dystrophy</i>	
2004-2006	M.Sc. candidate, Laboratory of Dr. Lambert Busque Centre de recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada Thesis title: <i>Characterisation of the X-chromosome inactivation skewing patterns and transmission in human neonates</i>	
2002-2004	Research assistant	Hémax Génome, Montréal, Canada
2001	Internship (3 months)	Svalöf Weibull AB, Svalöv, Sweden
2000	Internship (4 months)	DNA Landmarks Inc., St-Jean-Sur-Richelieu, Canada
1998-1999	Internships (8 months)	Laboratory of Dr. Robert Day, Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

AWARDS

2011	Thesis redaction grant, Programmes de biologie moléculaire (U de Montréal)
2010	Oral presentation award - 15 th International Congress of the World Muscle Society
2010	Scholarship for Doctoral Excellence (FAECUM)
2010	Fellowship award, 15 th International Congress of the World Muscle Society
2009	Poster presentation award, 12 ^e congrès des étudiants du CRCHUM
2009	Poster presentation award, XV ^e journée scientifique des programmes de biologie moléculaire
2008-2010	Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships – Doctoral Awards (CIHR)
2007	Scholarship for Doctoral Excellence (CHUM)
2007	Doctoral graduate training award (FRSQ)
2007	Bourse d'aide aux études (AFM)
2006	Fellowship award, World Muscle Society 11 th International congress
2005	Thesis redaction grant, Programmes de biologie moléculaire (U de Montréal)
2004	Master Excellence, Programmes de biologie moléculaire (U de Montréal)

PUBLICATION LIST

Published refereed papers

Srour M, Bolduc V, Guergueltcheva V, Lochmüller H, Gendron D, Shevell MI, Poulin C, Mathieu J, Bouchard JP, Brais B. *DOK7 mutations presenting as a proximal myopathy in French Canadians*. Neuromuscul Disord. 2010; 20(7):453-7.

Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, Robitaille Y, Parent L, Baas F, Mizuta K, Kamata N, Richard I, Linssen WHJP, Mahjneh I, de Visser M, Bashir R, Brais B. *Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies*. Am J Hum Genet. 2010; 86(2):213-21.

Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dubé MP, Belisle C, Gingras M, Mollica L, Busque L. *No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans*. J Clin Invest. 2008; 118(1):333-41.

Jarry J, Rioux MF, Bolduc V, Robitaille Y, Khoury V, Thiffault I, Tétreault M, Loisel L, Bouchard JP, Brais B. *A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12*. Brain. 2007; 130(Pt 2):368-80.

Chagnon P, Schneider R, Hebert J, Fortin P, Provost S, Belisle C, Gingras M, Bolduc V, Perreault C, Silverman E, Busque L. *Identification and characterization of an Xp22.33; Yp11.2 translocation causing a triplication of several genes of the pseudoautosomal region 1 in an XX male patient with severe systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum. 2006; 54(4):1270-8.

Chagnon P, Provost S, Belisle C, Bolduc V, Gingras M, Busque L. *Age-associated skewing of X-inactivation ratios of blood cells in normal females: a candidate-gene analysis approach*. Exp Hematol. 2005; 33(10):1209-14.

Published abstracts / notes

Bolduc V, Marlow G, Conte TC, Larivière R, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, Robitaille Y, Parent L, Baas F, Mizuta K, Kamata N, Richard I, Linssen WHJP, Mahjneh I, de Visser M, Bashir R, Brais B. *Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies*. 15th International Congress of the World Muscle Society, Kumamoto, Japan, October 14th, 2010.
(Oral presentation)

Marlow G, Bolduc V, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, Robitaille Y, Parent L, Baas F, Mizuta K, Kamata N, Richard I, Linssen WHJP, Mahjneh I, de Visser M, Brais B, Bashir R. *Identification of a novel group of muscular dystrophies, the Anoctaminopathies, caused by recessive mutations in the putative calcium activated chloride channel ANO5*. UK Neuromuscular Translational Research Conference 2010, Oxford, UK, March 25th-26th, 2010.

Bolduc V, Marlow G, Boycott KM, Conte TC, Larivière R, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, Robitaille Y, Parent L, Baas F, Mizuta K, Kamata N, Richard I, Linssen WHJP, Mahjneh I, de Visser M, Bashir R, Brais B. *Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L*

and distal MMD3 muscular dystrophies. The Ottawa Conference on New Directions in Biology & Disease of Skeletal Muscle, Ottawa, Canada, May 5th-8th, 2010.

(Poster presentation)

Bolduc V, Jarry J, Rioux MF, Robitaille Y, Thiffault I, Tétreault M, Dicaire MJ, Loisel L, Bouchard JP, Brais B. *Identification of the LGMD2M gene by SNP homozygosity mapping in a French-Canadian cohort.* Abstract 1823. The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting, Philadelphia PA, November 14th, 2008.

(Poster presentation)

Bolduc V, Thiffault I, Tétreault M, Dicaire MJ, Robitaille Y, Jarry J, Rioux MF, Loisel L, Mathieu J, Bouchard JP, Brais B. *LGMD2L is caused by mutations in the skeletal muscle highly expressed transmembrane TMEM16E gene.* 13th International World Muscle Society Congress, Newcastle Gateshead, UK, October 2nd, 2008.

(Oral presentation)

Bolduc V, Jarry J, Thiffault I, Tétreault M, Dicaire MJ, Provost S, Dubé MP, Loisel L, Rioux MF, Robitaille Y, Khoury V, Bouchard JP, Brais B. *Definition of the candidate-interval for a new form of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2L) using microsatellite- and SNP-based genotyping.* HUGO's 12th Human Genome Meeting, Montreal, Canada, May 21st-24th 2007.

(Poster presentation)

Bolduc V, Jarry J, Rioux MF, Robitaille Y, Khoury V, Thiffault I, Tétreault M, Loisel L, Bouchard JP, Brais B. *A novel recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12.* World Muscle Society 11th International congress, Bruges, Belgium, October 6th, 2006.

(Oral presentation)

Brais B, Bolduc V, Jarry J, Rioux MF, Robitaille Y, Khoury V, Thiffault I, Tétreault M, Loisel L, Bouchard JP. *Novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12.* Limb Girdle Muscular Dystrophies Symposium, Évry, France, 13 Mai 2006.

Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dube MP, Belisle C, Gingras M, Busque L. *Analysis of the genetic determination of primary skewing of X-inactivation in neonates.* The American Society of Human Genetics 54th Annual Meeting, Toronto, Canada, October 27th, 2004.

(Poster presentation)

Provost S, Bolduc V, Dube MP, Belisle C, Gingras S, Chagnon P, Busque L. *Analysis of concordance of X-inactivation patterns in haematopoietic and non-haematopoietic tissues of neonates and elderly females.* American Society of Human Genetics 54th meeting, Toronto, Canada, 28 octobre 2004.

Annexe II. Jarry, Rioux, Bolduc et al., *Brain* (2007)
130 : 368-80

A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13–p12

J. Jarry,¹ M. F. Rioux,^{1–5} V. Bolduc,¹ Y. Robitaille,³ V. Khoury,² I. Thiffault,¹ M. Tétreault,¹ L. Loisel,¹ J. P. Bouchard⁴ and B. Brais¹

¹Neurogenetics of Locomotion Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,

²Département de radiologie, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, ³Hôpital Ste-Justine, Montréal,

⁴CHA-Hôpital Enfant-Jésus, Université Laval and ⁵CHUS, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

Correspondence to: B. Brais, Centre for the Study of Brain Diseases, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

E-mail: [REDACTED]

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of pathologies. We have identified a cohort of 14 French–Canadian patients from eight different families displaying a novel form of LGMD with an autosomal recessive inheritance. These patients share some features with previously described cases of ‘quadriceps myopathy’ that evolved into an LGMD. All demonstrate quadriceps femoris asymmetrical atrophy. Creatine kinase values were variable from normal to 6000 U/l. Clinical evaluations and MRI studies demonstrate a variable intrafamilial and interfamilial phenotype. Asymmetrical muscle involvement was clinically observed and confirmed by imaging. MRI studies suggest that the hamstrings and the adductor magnus are the first limb muscles to demonstrate fatty infiltration. Muscle pathology shows no sign of active inflammation but increased endomysial connective tissue associated with basal lamina duplication and collagen disorganization. A genome-wide scan using the two largest families uncovered linkage to marker D11S1360 on chromosome 11p12 [multipoint logarithm of the odds (LOD) score of 2.78]. Further genotyping for the eight families confirmed linkage to this new LGMD locus (multipoint LOD score of 4.56). Fine mapping subsequently defined a less than 3.3 cM candidate interval on 11p13–p12. Haplotype analysis of carrier chromosomes suggests that the most frequent mutation may account for up to 81.3% of French–Canadian mutations. In this study, we describe the chromosomal locus of a new form of recessive LGMD with prominent quadriceps femoris atrophy.

Keywords: autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy; quadriceps atrophy; genome-wide scan; linkage analysis

Abbreviations: CK = creatine kinase; EMG = electromyogram; IBM = inclusion body myositis; LGMD = limb-girdle muscular dystrophy; LOD = logarithm of the odds; TRIM = tripartite motif

Received June 27, 2006. Revised August 11, 2006. Accepted August 23, 2006. Advance Access publication September 28, 2006.

Introduction

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are defined as a weakness and wasting of the limb-girdle muscles, with typical sparing of the facial muscles (Wicklund, 2003). The various forms of LGMD have been classified based on their mode of transmission, their mutated gene or chromosomal locus. To date, 7 autosomal dominant forms (LGMD1A–G) and 11 autosomal recessive forms (LGMD2A–K) have been characterized. The different autosomal recessive LGMDs (AR-LGMDs) display some epidemiological or clinical differences that may help their clinical distinction (Bushby, 1999). Four AR-LGMDs have been found to exist more in

specific populations: LGMD2G in Brazil, LGMD2H in the Manitoba Hutterites of Canada, LGMD2J in Finland and LGMD2I in Denmark (Zatz *et al.*, 2003; Sveen *et al.*, 2006). Variable muscle involvement is present in the different LGMD. Quadriceps femoris atrophy has been described in LGMD2A, LGMD2B, LGMD2D, LGMD2H and LGMD2I (Fischer *et al.*, 2005), but it is more frequent in the latter three forms. Only in LGMDH is it a constant finding (Table 1).

Cases of quadriceps myopathy have been described in the literature at least since 1922 (Bramwell, 1922). In the oldest

Table 1 Comparison of LGMD2L clinical characteristics to other recessive LGMD

Locus	Gene symbol	Age of onset	Intrafamilial variability	Affected muscles	Asymmetrical wasting	Facial muscle wasting	Scoliosis	Quadriceps wasting	Calf hypertrophy	Cardiomyopathy
LGMD2A	15q15.1 CAPN3	2–53, mean: 13.7	+	Gluteus maximus, thigh adductors	–	–	+	+	+	–
LGMD2B	2p13 DYSF	Teens: early 30s	+	Proximal lower limbs and pelvic girdle, then all	+	–	nr	+	–	–
LGMD2C-F	13q, 17q, 4q, 5q γ -, α -, β -, δ -SGC	1–15	+	Limb-girdle and truncal muscles, thigh flexors	nr	nr	+	+	+	+
LGMD2G	17q11–q12 TCAP	2–15, mean: 12.5	+	Proximal upper limbs and proximal and distal lower limbs	nr	–	nr	nr	+	+
LGMD2H	9q31–q34 TRIM32	1–9	+	Quadriceps and pelvic girdle	nr	+	nr	+	–	–
LGMD2I	19q13.3 FKRP	0–40	+	Shoulder girdle, hip flexors and hamstrings	nr	–	+	+	+	+
LGMD2J	2q31 TTN	1st–3rd decade	+	Proximal lower limbs and scapulohumeral musculature	nr	–	nr	nr	–	+
LGMD2K	9q34.1 POMT1	1–6	nr	Proximal muscles	nr	–	+	nr	+	nr
LGMD2L	11p13–p12	11–50, mean: 32.7	+	Hamstring muscles, adductor magnus, quadriceps, biceps brachii	+	–	–	+	–	–

–: absent; +: present; nr: none reported in the literature, but no clear statement of absence.

reports, the disease seems to have been restricted to the quadriceps muscles with weakness and atrophy not spreading to other muscle groups (Denny-Brown, 1939; Walton, 1956; Turner and Heathfield, 1961; Mümenthaler, 1970; Boddie and Stewart-Wynne, 1974). Later observations suggested that in some cases it evolved into an LGMD (Walton, 1956). In 1974, Boddie and Stewart-Wynne suggested that quadriceps myopathies represent a clinical syndrome with heterogeneous pathological bases rather than a specific entity (Boddie and Stewart-Wynne, 1974). Strikingly, many of the cases described presented biopsy and electromyogram (EMG) findings suggesting both active dystrophic and neurogenic processes (Serratrice and Munsat, 1995). While most of these early described cases appear to be sporadic, some familial cases have been described. In 1970, Mümenthaler described two brothers with a shared quadriceps myopathy (Mümenthaler, 1970) and Furukawa *et al.* (1997) described a case whose parents were first-degree cousins (Furukawa *et al.*, 1977). In 1973, Espir and Matthews published a study of a dominant quadriceps myopathy affecting a father, his three daughters and one of his brothers (Espir and Matthews, 1973). Sunohara *et al.* (1990) described four male patients with quadriceps myopathy, all of whom showed a mild and slowly progressive myopathy clinically confined to the quadriceps muscles but who, on careful EMG and histological examinations, had more widespread muscle involvement (Sunohara *et al.*, 1990). Dystrophin testing by immunofluorescence studies and immunoblotting were compatible with a diagnosis of Becker muscular dystrophy. The authors concluded that although the ‘quadriceps syndrome’ may result from a variety of heterogeneous diseases, at least a subset of these patients in fact have Becker muscular dystrophy. The observation that the majority of cases of quadriceps myopathy are men was underlined by Munsat and Serratrice (1995). In 2003, Charniot *et al.* described the autosomal dominant segregation in a French family of a quadriceps atrophy associated with a severe dilated cardiomyopathy with conduction defects or atrial/ventricular arrhythmias (Charniot *et al.*, 2003). Cardiac involvement preceded neuromuscular disease in all affected patients. They detected an Arg377-to-His mutation in the lamin A/C protein (LMNA). This mutation had been reported in limb-girdle muscular dystrophy type 1B, a slowly progressive LGMD with age-related cardiac conduction disturbances and the absence of early contractures. These latter two families further support the conclusion that quadriceps atrophy can indeed be found in different genetic conditions. In fact, quadriceps atrophy has been mostly associated with sporadic inclusion body myositis (IBM) (Phillips *et al.*, 2001). This sporadic inflammatory myopathy presents with an insidious onset of slowly progressive proximal and distal weakness and atrophy, particularly affecting the quadriceps and forearm muscles (wrists and finger flexors) and ankle dorsiflexors. Unlike this sporadic form, hereditary IBM, which links to 9p12–p11 and

is caused by mutations in UDP-*N*-acetylglucosamine 2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase (GNE), is known to spare the quadriceps entirely (Eisenberg *et al.*, 2001). On the other hand, in autosomal dominant IBM3, caused by mutations in the MYHC2A gene, quadriceps atrophy is a prominent feature (Darin *et al.*, 1998). In conclusion, most authors believe that quadriceps myopathy is not a single entity but may be found in different disorders. This study is the first to describe a group of patients affected by a recessive LGMD associated with prominent and asymmetrical quadriceps femoris atrophy linked to 11p13–p12.

Material and methods

Clinical assessment

Familial cases were recruited at the Notre-Dame and Hôtel-Dieu hospitals of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). We identified 14 patients (9 males and 5 females) aged 27–68 years old and belonging to 8 families. Neurological examination was performed by two neurologists experienced in neuromuscular disorders (M.F.R., B.B.). First-degree relatives were examined when possible, and genealogical and geographical data were collected by a research nurse (L.L.). Patients were included in our cohort if they presented with weakness of limb-girdle muscles and atrophy of the medial part of the quadriceps femoris. Serum creatine kinase (CK) levels were measured in all affected individuals and most of their first-degree relatives. Previous EMG results were reviewed and histopathological data were gathered on muscle biopsies on 11 cases. Patients signed an informed consent approved by the CHUM's ethics committee.

MRI

Muscle MRI was performed on a 1.5-tesla Siemens Avanto system (PA, USA). Axial and coronal planes of the thighs and upper arms were obtained, positioned to include part of the pelvic and shoulder girdles, respectively, using conventional T1-weighted spin echo (repetition time TR of 500 ms, echo time TE of 13 ms, with slight variations) and short tau inversion recovery sequences. Fat-saturated T1-weighted images post-intravenous gadolinium injections were obtained for some patients only. The slices were 10 mm thick for the lower extremities and 6–10 mm thick for the upper extremities, with an interslice gap of 6–10 mm. The T1-weighted images were evaluated with regard to degree of muscle atrophy (volume loss) and intramuscular fatty infiltration.

Fluorescent and electron microscopy

A muscle biopsy on case IX-15's quadriceps femoris was obtained for diagnostic purposes in 1999. He signed an informed consent to allow us to review the sample in the context of this project. The biopsied muscle was frozen in liquid nitrogen after removal and stored at –70°C until use. Routine histological and histochemical procedures were done, with staining for H & E, HPS, Gomori trichrome, PAS, ATPase 9.5, ATPase 4.6, ATPase 4.3, NADH, glycerol phosphate dehydrogenase and acidic phosphatases. Isoforms 1, 2 and 3 of dystrophin, γ -sarcoglycan (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) were processed according to the indirect immunoperoxidase technique of Sternberger (1969). DAB was used as a chromogen. Case IX-15's muscle biopsy was processed according to usually

prescribed techniques, which involved inserting a portion of the specimen on a pair of forceps for glutaraldehyde fixation. After fixation in 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer, specimens were stained with saturated uranyl acetate and embedded in Epon. Numerous semi-thin sections stained by paraphenylenediamine were screened by the Nomarski method (Schindl and Rueker, 1973). Representative thin sections were examined with a Phillips EM 208 S electron microscope (Fei Electron Optics BV, Eindhoven, The Netherlands). No other biopsy was examined in the context of this study, only available reports were reviewed.

Exclusion of the LGMD2H and HIBM loci

Genomic DNA was extracted from blood samples according to previously described methods (Zelinski, 1991). Linkage analysis to the LGMD2H locus was performed using standard techniques as will be described under 'Linkage analysis' using four selected polymorphic STR markers (D9S241, D9S170, D9S154 and D9S737) surrounding the TRIM32 gene. Screening for mutations in the GNE gene mutated in hereditary IBM (HIBM) was conducted by sequencing the exons and exon/intron boundaries, as will be described under 'Sequencing of candidate genes'. Primers were designed using the ExonPrimer tool (<http://ihg.gsf.de/>), based on the sequence provided by the UCSC genome browser.

Genome-wide scan and fine mapping

A genome-wide scan was performed on six affected cases (VIII-3, VIII-4, VIII-6, IX-10, IX-11 and IX-15) and four unaffected relatives (VIII-1, VIII-5, IX-12 and IX-14) at deCODE Genetics (Reykjavik, Iceland). Genotypes were generated for 500 polymorphic microsatellite markers separated by an average of 8 cM. The main region of interest was fine mapped using known microsatellite markers and markers designed based on the genomic sequence of the region (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). Three oligo pairs were designed using Primer3 (Rozen, 2000), based on the genomic sequence (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly): EEJ11AC19 (forward primer: TTG CTT TCA TAT GGA TGC TGT; reverse primer: TTG CTG CAT TCA CCA ATA GC), FFJ11TA27 (forward primer: TCC ATG ACC TCT GGG AAG G; reverse primer: CAC CAG CTG GAC CTG TCT TA) and GGJ11GA24 (forward primer: GCA AAA ACA TGC TGG TGG T; reverse primer: CAC ACA TCT AGG GCT GGT GA). Oligonucleotide primers were synthesized at Invitrogen (CA, USA). Fragment analysis was performed on a LI-COR Gene Reader 4200 (NE, USA).

Linkage analysis

Multipoint autosomal recessive parametric linkage was computed using GENEHUNTER v.2.1 (Kruglyak *et al.*, 1996). Phenocopy number was set to zero. Six liability classes were defined based on the reported age of onset: 0–19 years (18%), 20–29 (29%), 30–39 (65%), 40–49 (82%), 50–59 (94%), and 60 and over (100%). Allele frequencies were considered equal for most markers. Allele frequencies provided by deCODE Genetics and based on genotypes of 186 chromosomes from French–Canadian individuals not participating in this study were used for the markers of the genome scan. One cM was assumed to be equivalent to 1 Mb. Two-point linkage analysis of X-chromosome markers was computed using MLINK of LINKAGE (Lathrop and Lalouel, 1984; Lathrop *et al.*, 1984, 1986). The haplotypes were reconstructed using the MAXPROB method of GENEHUNTER.

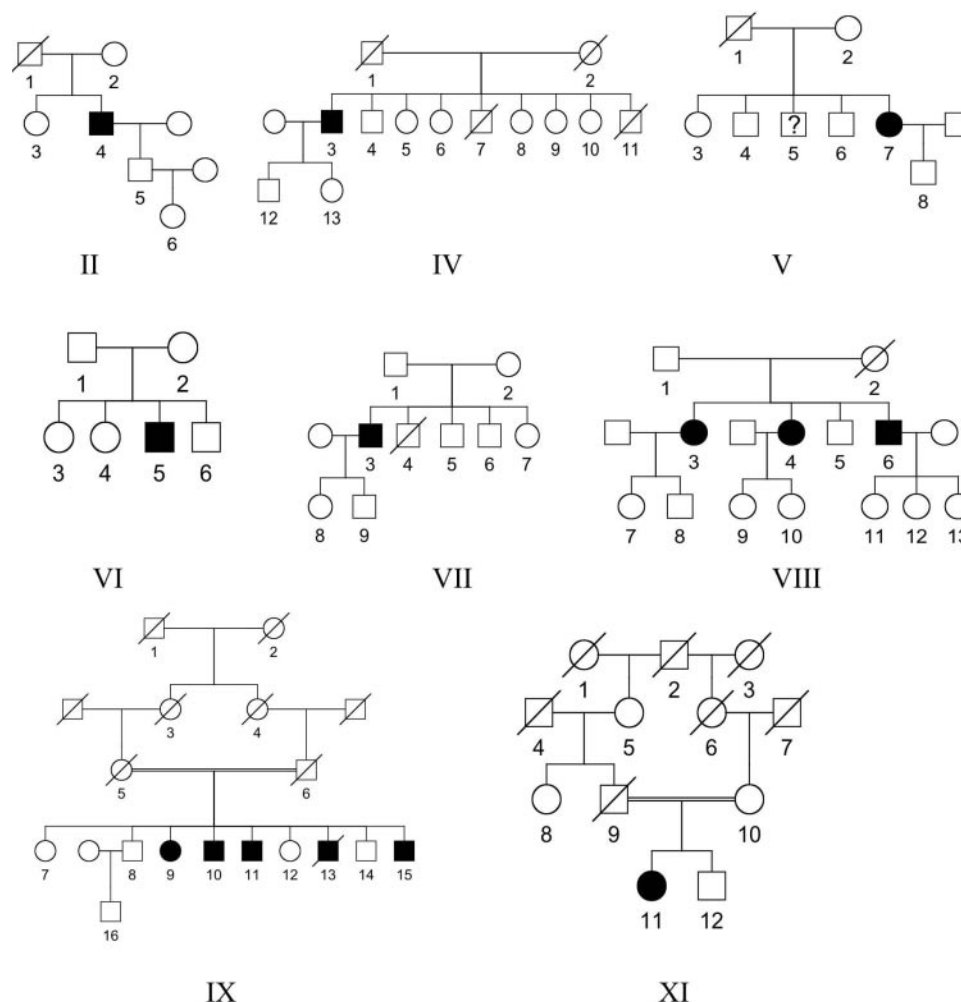


Fig. 1 Pedigrees of the LGMD2L families.

Sequencing of candidate genes (TRIM44, TRAF6 and LOC119710)

The entire coding and 30 bp flanking intronic sequences for the three genes were amplified for mutation analysis. Primers flanking exons to be sequenced were designed using Primer3 (Rozen, 2000). The first exon of TRIM44 and the last exon of TRAF6 were divided into three overlapping fragments due to their size. The PCR products and primer pairs were sent to the McGill University and Génome Québec Innovation Centre for forward and reverse sequencing. Sequences were aligned using SeqMan 4.03 (DNASTar, WI, USA) and analysed using Chromas 1.62 (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Results

Clinical phenotype

Fourteen patients aged between 27 and 68 and belonging to eight families were examined (Fig. 1). All eight families are of French–Canadian descent. The percentage of affected cases in these families is compatible with a recessive mode of inheritance (36%, 14 cases/39 siblings, 9 males/5 females), though we observed more cases than expected in our 2

largest families (3 out of 4 in family VIII and 5 out of 8 in family IX). In all families, there is no history of a similar condition in parents. All cases show a limb-girdle type of muscular dystrophy with prominent biceps brachii and quadriceps femoris atrophy (Fig. 2A and F). The latter is particularly prominent at the level of the medial distal thigh (Fig. 2F). There is a wide range of age of onset (mean 32.7 years, 11–50 years). Case IX-9 even claimed to be asymptomatic at the age of 68 despite observed weakness on examination and elevated CK of 1649 U/l (Table 2). Contractures are seen in only one patient (7.1%), case V-7, who has been wheelchair bound for the past 4 years: they were present at the level of the elbows, wrists, fingers, hamstrings and ankles. Muscular pain, however, is reported in the majority of our patients (85.7%), with seven patients complaining of myalgia following exercise (50.0%). Mild calf hypertrophy (IV-3, VI-5, VII-3) and facial weakness (IV-3, VII-3) are rarer findings. Scoliosis was not observed in any of our patients. Only VII-3, aged 58, has a known cardiomyopathy with a left ventricular ejection fraction of 20%, which is probably related to his coronary heart disease.

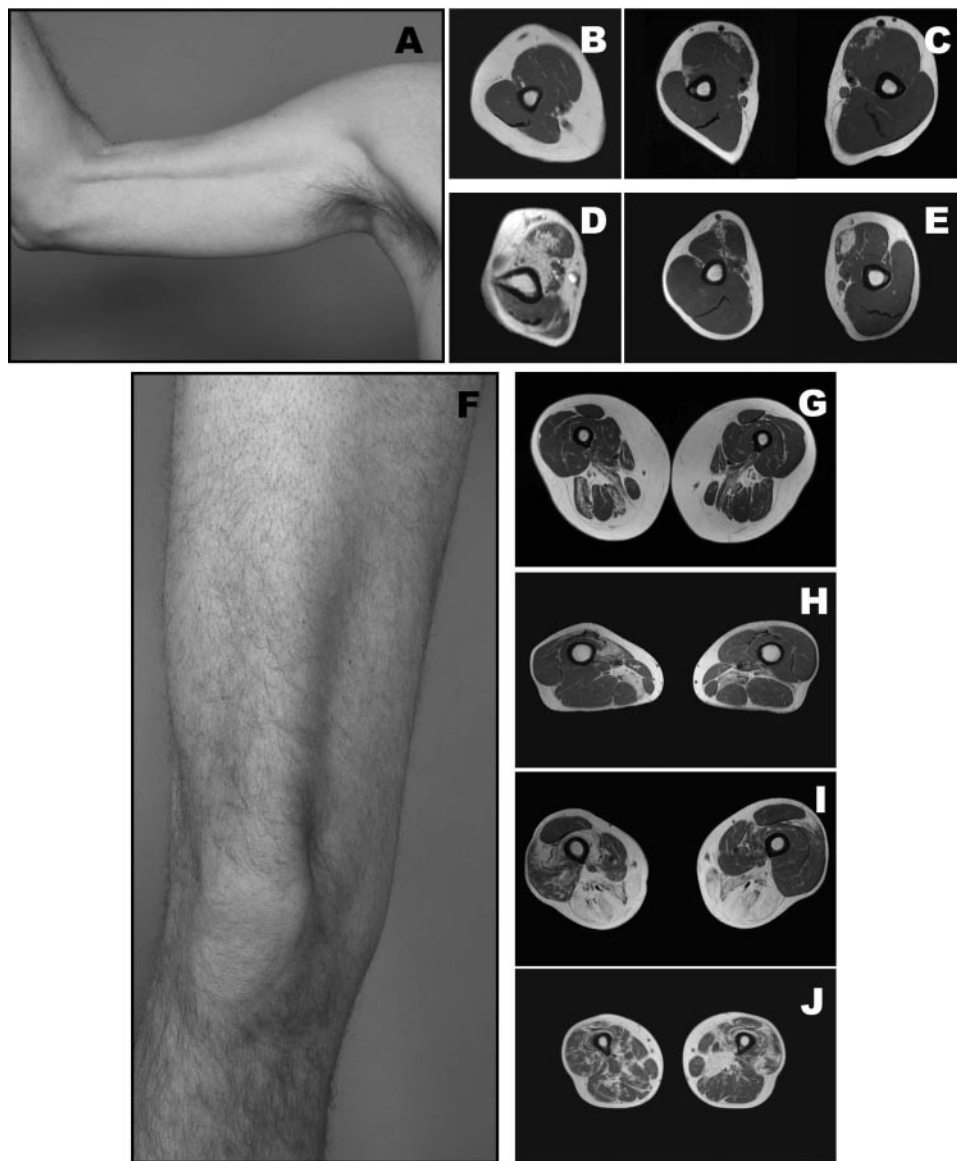


Fig. 2 Atrophy of the arm and thigh muscles as clinically assessed on patients IX-11 and IX-15 and for four patients on MRI. (A) Atrophy of the biceps in patient IX-11. (B) Asymptomatic patient IX-9 shows no clear atrophy of arm muscles. (C) Moderately affected patient IX-15 shows mild atrophy and fatty replacement for the long head of the right biceps brachii and moderate atrophy and fatty replacement for the long head of the left biceps brachii. (D) Severely affected patient VIII-6 reveals a marked atrophy of the biceps brachii and brachio-radialis with a minimal atrophy of the triceps. (E) Moderately affected patient IX-11 showed mild atrophy and fatty replacement in the long head of the left biceps and moderate atrophy and fatty replacement in the long head of the right biceps. (F) Atrophy of the medial part of the quadriceps in patient IX-15. (G) Asymptomatic patient IX-9 shows no clear involvement of the quadriceps but a mild to moderate asymmetrical atrophy and fatty replacement of the hamstring muscles (biceps femoris and semitendinosus) and the adductor magnus. (H) Moderately affected patient IX-15 shows a severe atrophy and fatty replacement for the adductor magnus bilaterally, the right vastus medialis and the short head of the left biceps femoris and a moderate atrophy of the tensor fasciae latae bilaterally. (I) Moderately affected patient IX-11 displays a severe atrophy of the adductor magnus, the hamstrings, the tensor fasciae latae, the gracilis, and the glutei minimus and medius bilaterally, with a moderate atrophy of the vasti lateralis, intermedius and medialis on the right and mild wasting of the right adductor longus. (J) Severely affected patient VIII-6 reveals a moderate to severe atrophy of the vasti intermedius, medialis and lateralis, the semimembranosus, the left adductor magnus and the gluteus minimus, associated with a milder atrophy of the gluteus maximus, the gluteus medius, the rectus femoris, the tensor fasciae latae and the remainder of the hamstrings group.

Four patients out of fourteen (28.6%) are wheelchair bound. The mean age of wheelchair use is 44.3 years, on average 12 years after diagnosis. In our two largest families, males are clearly more affected than their sisters (Table 2).

Furthermore, the four brothers of family IX demonstrate a very variable degree of involvement. The variability of the phenotype extends to the level of the individuals, with clear asymmetrical involvement of the same muscles.

Table 2 Clinical data on the LGMD2L cohort

Fam-ID	Sex	Age in 2005	Age of onset	Contractures	Quadriceps atrophy	Myalgia	Calf hypertrophy	Facial weakness	Scoliosis	Cardiomyopathy	Wheelchair onset	CK (U/l)	EMG	Muscle biopsy
II-4	M	59	42	No	Yes	No	No	No	No	No	No	500–2500	Myopathy	Myopathy
IV-3	M	64	40	No	Yes	Articular	Yes	Mild	No	No	58	751	Myopathy	Neurogenic muscular atrophy
V-7	F	44	32	Elbow, wrist, finger, hamstring, ankle	Yes	Post-exercise	No	No	No	No	39	48	Myopathy w/ spontaneous activity	Neurogenic muscular atrophy
VI-5	M	34	21	No	Yes	Post-exercise	Yes	No	No	No	No	1851	Myopathy	Dystrophy
VII-3	M	58	16	No	Yes	Articular	Yes	Moderate	No	Yes, LVEF 20%	46	202	n/a	Dystrophy
VIII-3	F	48	44	No	Yes	Lumbar pain	No	No	No	No	No	99	n/a	n/a
VIII-4	F	46	33	No	Yes	Lumbar and leg pain	No	No	No	No	No	69	n/a	n/a
VIII-6	M	37	30	No	Yes	Lumbar pain	No	No	No	No	No	254	Myopathy	Myopathy with rimmed vacuoles
IX-9	F	68	n/a	No	Yes	No	No	No	No	No	No	1649	n/a	n/a
IX-10	M	67	50	No	Yes	With exercise	No	No	No	No	No	1000–3000	Myopathy	Dystrophy
IX-11	M	65	37	No	Yes	With exercise	No	No	No	No	No	700–3000	Myopathy	Normal
IX-13	M	Died at 54	30	No	Yes	With exercise	No	No	No	No	34	3000	n/a	Dystrophy
IX-15	M	47	39	No	Yes	With exercise	No	No	No	No	No	3000–6000	Myopathy	Dystrophy
XI-11	F	27	11	No	Yes	Post-exercise	Yes	No	No	No	No	258	n/a	Dystrophy

LVEF: left ventricular ejection fraction.

Laboratory findings reveal mildly to moderately elevated serum CK levels in 10 (71.4%) of our patients (mean: 1290, 254–6000 U/l, with a normal range of 37–217) (Table 2). Four patients (28.6%) have normal serum CK: these are V-7, VII-3, VIII-3 and VIII-4. Previous EMG reports were available on eight patients. These showed normal motor and sensitive nerve conductions but documented myopathic changes with small amplitude polyphasic potentials (Table 2). Five patients (35.7%) also showed minor signs of possible neurogenic changes: increased insertional activity in one patient; mild spontaneous activity with positive waves and fibrillations in another patient; and important spontaneous activity with positive waves, fibrillation, and repetitive discharges and high amplitude motor unit potentials associated with reduced recruitment at maximal effort in patients IX-10, IX-11 and IX-15.

MRI

Inspection of muscles revealed a more pronounced atrophy of the biceps brachii and the medial part of the quadriceps femoris (Fig. 2A and F). MRI was performed on four patients. Cases VIII-6, IX-11 and IX-15 were chosen because they are all moderately to severely affected and belong to two different families (VIII and IX): VIII-6, a 37-year-old, severely affected man; IX-11, a 65-year-old man with a somewhat milder phenotype; and IX-15, a 47-year-old man similarly affected. We chose to study case IX-9 as well, the asymptomatic 68-year-old sister of IX-11 and IX-15. She had elevated CKs (1649 U/l) documented since her forties and on examination had mild biceps brachii atrophy and weakness, as well as mild iliopsoas and quadriceps weakness.

In the upper extremities, case IX-9 showed no clear atrophy (Fig. 2B). Her brother, IX-15, displayed normal brachio-radialis and triceps, but a mild atrophy and fatty replacement was noted for the long head of the right biceps brachii with a moderate atrophy and fatty replacement in the long head of the left biceps (Fig. 2C). Patient IX-11 revealed similar findings, with a mild atrophy and fatty replacement in the long head of the left biceps and moderate atrophy and fatty replacement in the long head of the right biceps (Fig. 2E). Individual VIII-6's images revealed a marked atrophy and fatty infiltration of the biceps brachii and brachio-radialis accompanied by a minimal atrophy of the triceps (Fig. 2D). The right side was more affected than the left, which corresponded to the observed asymmetry on physical examination.

In the lower extremities, patient IX-9 displayed no clear involvement of the quadriceps, but an asymmetrical, mild to moderate atrophy and fatty replacement of the hamstring muscles (biceps femoris and semitendinosus) and of the adductor magnus were observed (Fig. 2G). Case IX-15 presented with severe atrophy and fatty replacement of the adductor magnus bilaterally (slightly less severe on the left), of the right vastus medialis and of the short head of the left

biceps femoris (Fig. 2H). Moderate atrophy was also noted for the tensor fasciae latae bilaterally. The adductors brevis and longus, iliopsoas, gracilis, sartorius and glutei were normal. His brother, patient IX-11, showed a severe atrophy of the adductor magnus, the hamstrings, the tensor fasciae latae, the gracilis, and the glutei minimus and medius bilaterally (Fig. 2I). Moderate atrophy of the vastus lateralis, intermedius and medialis on the right was also noted, with a mild wasting of the right adductor longus. Finally, case VIII-6 revealed a severe atrophy of the medial part of the thigh (Fig. 2J) which corresponds to a moderate to severe atrophy of the vastus intermedius, the vastus medialis, the vastus lateralis and the semimembranosus. Severe atrophy of the left adductor magnus and gluteus minimus bilaterally was present. Mild atrophy was found of the gluteus - maximus and medius, rectus femoris, tensor fasciae latae, and remainder of the hamstrings group. No involvement of the piriformis, iliopsoas, sartorius and gracilis was documented.

Therefore, in the lower extremities, atrophy seems to predominate in the hamstring muscles, the adductor magnus and the medial part (vasti medialis and intermedius) of the quadriceps femoris, while the biceps brachii seem to be affected in most cases in the upper extremities. The clear asymmetry documented clinically in all four patients in the upper and lower extremities was well correlated with the MRI findings.

Muscle histology

At this stage of our research, only case IX-15 has been thoroughly studied. However, previous muscle biopsy reports were available for 11 of our patients (78.6%) (Table 2). Biopsies from nine of these individuals were described by different pathologists as displaying dystrophic changes with variation in fibre sizes, degeneration and regeneration of muscle fibres, internal nuclei, and notable increase in endomysial connective tissue and fibre splitting. In patients IV-3 and V-7, neurogenic changes were seen with minor group atrophy and some angular fibres. Mild focal inflammation was reported only in the muscle of the more severely affected case, VIII-6. Available muscle on patient IX-15 was reviewed by an experienced neuropathologist (Y.R.). Deficiencies in dystrophin, dysferlin and sarcoglycans were excluded by immunohistochemistry and western blots (data not shown). Electron micrographs on IX-15's biopsy revealed focal duplication of the muscle basement membrane (Fig. 3C). Endomysial extracellular matrix is increased and disorganized, as several collagen protofibrils can be seen spread out in a starburst pattern haphazardly in the endomysium without internal spacing and intermingling with the obscured basement membrane (Fig. 3B and C). Strands of dense flocculent material can also be seen next to the basement membrane, further showing a disorganization of the extracellular environment close to the muscle fibre (Fig. 3D). ATPase staining on IX-15's biopsy showed both

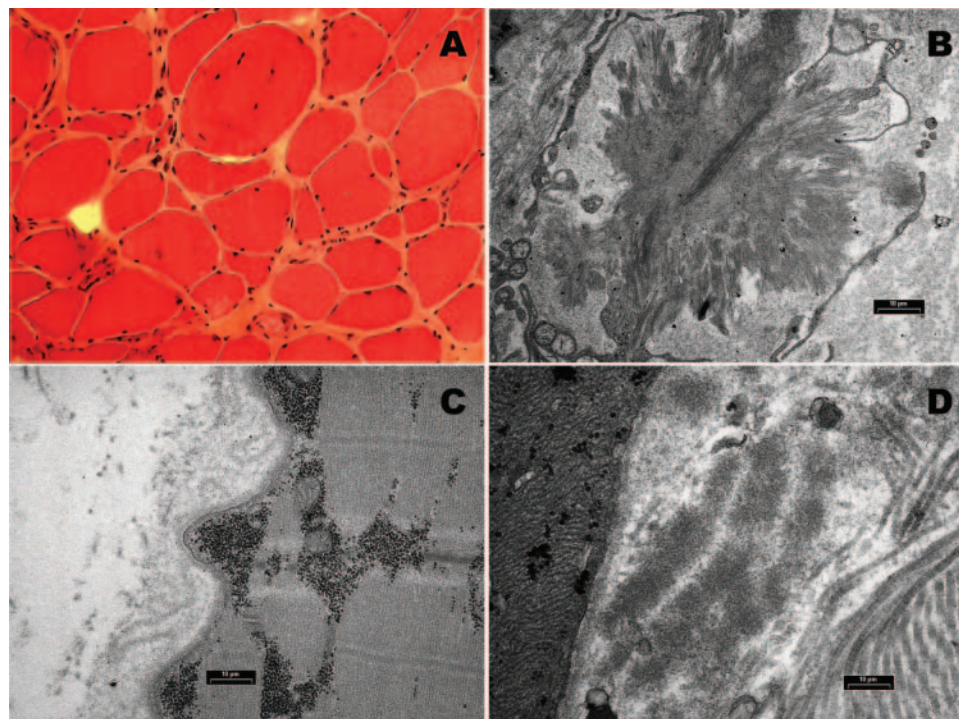


Fig. 3 (A) HPS stain, $\times 200$. Small groups of atrophic fibres admixed with hypertrophic fibres. (B) EM microphotograph, $\times 7100$. Starburst-like organization of collagen protofilaments in perimysium. (C) EM microphotograph, $\times 18\,000$. Reduplicated basement membrane associated with multifocal loss of sarcolemmal membrane. (D) EM microphotograph, $\times 18\,000$. Strands of dense flocculent material adjacent to thickened basement membrane on left-hand side, and long spacing collagen, lower right. On microphotographs (B, C and D), the bar indicates 10 microns.

type 1 and type 2 fibre atrophy without predominance. Similar absence of clear fibre type grouping was observed on the biopsy of patient VIII-6. The few groups of either type I or type II fibres on these two biopsies were small and more akin to a myopathic type of microfascicular grouping (data not shown).

Exclusion of HIBM and LGMD2H

To exclude the possibility that our phenotype is in fact a variant form of HIBM, we sequenced the entire GNE gene for mutations in two patients (VIII-3 and IX-10) and one carrier (father of family VIII, VIII-I). No variant was uncovered. Moreover, we tested the entire cohort for linkage to the TRIM32 locus, the mutated gene responsible for LGMD2H (Frosk *et al.*, 2002). LGMD2H is the recessive LGMD in which quadriceps atrophy is the most consistent feature (Table 1) (Shokeir and Kobrinsky, 1976; Shokeir and Rozdilsky, 1985). A negative logarithm of the odds (LOD) score of -23 was obtained by GENEHUNTER, confirming that our families are not linked to the LGMD2H locus.

Mapping of the LGMD2L locus

Genealogical data on family IX indicated the parents of the affected individuals were first-degree cousins, thereby limiting the chances of two or more mutations within the family and increasing the odds of strong homozygosity at the

disease locus (Fig. 1). Individuals IX-10, IX-11 and IX-15 were thus selected for a genome-wide scan along with an unaffected brother (IX-14) and sister (IX-12). Family VIII was comprised of three affected siblings and one unaffected brother. All four siblings, as well as their father, were sampled and selected for the genome scan. A medium-density genome-wide scan was thus performed at deCODE Genetics (Reykjavik, Iceland) using 500 polymorphic microsatellite markers. Genotypes were analysed using GENEHUNTER's MAXPROB multipoint linkage method (Kruglyak *et al.*, 1996). The highest LOD score (2.78) was obtained for marker D11S1360 located on chromosome 11p12. Only one other peak was obtained above a 2.0 threshold, with a LOD score of 2.16 on chromosome 4. Two-point linkage analysis on MLINK did not uncover any linkage to X-linked markers (data not shown). Multipoint LOD scores were positive for a 17 cM region on 11p12, centred on and peaking at D11S1360. To confirm linkage of our families to the 11p12 locus, we tested the entire cohort against all three consecutive markers from the genome scan (D11S1776, D11S1360 and D11S4191). A maximum multipoint LOD score of 3.81 for D11S1360 was obtained on GENEHUNTER for six of the eight families. The remaining two families, VII and XI, showed negative LOD scores for the first set of tested markers.

Fine mapping of the 17 cM region was conducted by saturating it with all known informative microsatellite

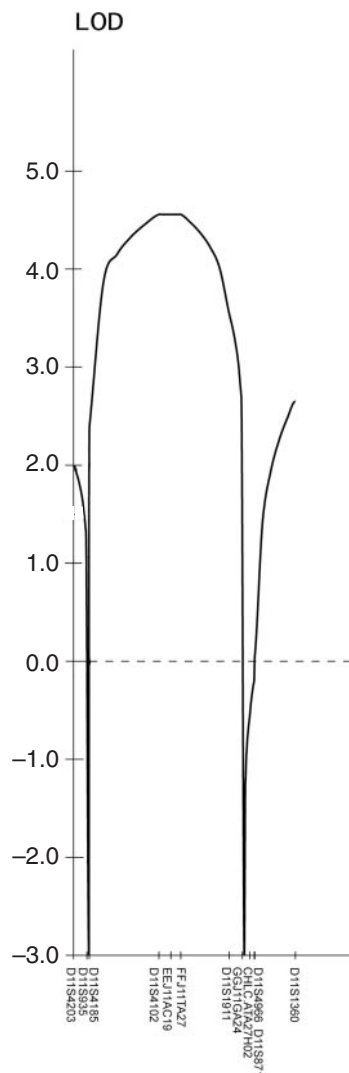


Fig. 4 Multipoint LOD score distribution for the eight LGMD2L families at the 11p13–p12 locus.

markers as well as a set of three markers designed based on genomic repeat sequences found in the region (<http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly). Genotypes generated with marker D11S4083 were excluded from the analyses, because this marker was found to have a very high mutation rate. Recruited individuals for all eight families were genotyped and linkage analysis was computed by GENE-HUNTER. A maximum cumulative LOD score of 4.56 was obtained for markers D11S935–GGJ11GA24 for all eight families, defining a less than 3.3 cM (1.4 Mb) region (Fig. 4). Since GGI1GA24 is not on the deCODE genetic map, the size of the interval in cM was estimated with the next deCODE marker, D11S4966. Haplotype analysis demonstrated that up to 81.3% of carrier chromosomes share a two-marker haplotype (Fig. 5). Ten out of 16 carrier chromosomes (62.5%) share a three-marker haplotype. One of the chromosomes shared by the affected individuals of family IX, IXb, might be linked to the common haplotype if

allele 2 of marker D11S4185 is identical by descent. Family IX is linked to the locus with a LOD score of 1.72. Two chromosomes (12.5%), IV-3b and VI-5b, appear to share a second, distinct three-marker haplotype. Chromosome VII-3b does not share alleles with the previous two haplotypes. The presence of shared haplotypes further supports our hypothesis that a more common LGMD2L mutation is present in the French–Canadian population. Present haplotype data suggest that probably two to three mutations will be found in our cohort. Based on the hypothesis that two distinct recombination events have reshaped the IXb chromosome in the consanguineous IX family (Fig. 5), this would make D11S935 the telomeric flanking marker and D11S4102, the centromeric flanking marker for a 1.4 cM (725 kb) interval.

Sequencing of the TRIM44, TRAF6 and LOC119710 genes

Intriguingly, TRIM44, a member of the tripartite motif (TRIM) family, lies 0.19 Mb telomerically to D11S935. Because TRIM32 is mutated in LGMD2H (Frosk *et al.*, 2002), we decided to sequence TRIM44. TRIM32 likely participates in myofibrillar protein turnover, via its ability to ubiquitinate actin and to bind myofibrils (Kudryashova *et al.*, 2005). The function of TRIM44 is still unknown, but as it possesses the characteristic RING domain of ubiquitin ligases, it may potentially play a similar role to TRIM32. We sequenced TRIM44 in one affected patient and one carrier from three families (VIII-6, VIII-5, IX-8, IX-10, VI-5 and VI-6). No variant was found. Eight known genes lie in the less than 3.3 cM candidate interval. We chose to sequence two that we felt were the most promising candidate genes for LGMD2L: TRAF6 and LOC119710. TRAF6, which lies in the middle of our interval, is mainly involved in the immune system as an adapter protein for dendritic cell maturation and cytokine production (Kobayashi *et al.*, 2004). It also mediates activation of NF κ B and JNK, both major players in apoptosis (Bharti *et al.*, 2004). Most studies have investigated TRAF6's immunological function in the IL-1 receptor/Toll-like receptor pathway. However, TRAF6, as a tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factor, could also be linked to the development of skeletal muscles, since it has been reported that TNF α inhibits myogenic differentiation through the NF κ B-dependent destabilization of the MyoD protein activity, which interferes with skeletal muscle regeneration and may contribute to muscle wasting (Langen *et al.*, 2004). Moreover, TRAF6 is part of the neurotrophin pathway through its interaction with the p75 neurotrophin receptor (Roux and Barker, 2002). The receptor activates NF κ B, Akt and JNK pathways, and TRAF6 has been shown to promote cell survival in this context. The adapter protein, RIP2, which binds the p75 neurotrophin receptor, provides a bifunctional switch for the survival and death of Schwann cells (Khursigara *et al.*, 2001). Hence, mutations in TRAF6 could have a potential

FAM-ID	D11S4203	D11S935	D11S4185	D11S4102	EE11AC19	FFJ11TA27	D11S1911	GGJ11GA24	CHLC.ATA27H02	D11S4966	D11S871	D11S1360
deCODE (cM)	52.63	52.94	52.95	54.35	n/a	n/a	55.77	n/a	n/a	56.27	56.27	57.09
Marshfield (cM)	45.94	45.94	45.94	47.61	n/a	n/a	50.88	n/a	n/a	48.73	n/a	50.88
Mb	35.77	35.98	36.01	36.73	36.93	37.04	37.17	37.37	37.45	38.24	39.14	40.19
II-4a	6	4	2	4	2	2	3	4	2	3	4	5
II-4b	6	6	2	4	6	10	6	4	3	3	5	5
IV-3a	3	2	2	4	5	10	6	4	3	3	5	4
IV-3b	7	6	1	4	2	8	5	4	3	2	6	5
V-7a	5	2	2	9	2	6	5	4	3	3	3	5
V-7b	7	2	2	3	3	6	3	4	2	3	6	5
VI-5a	4	2	2	4	5	4	5	4	3	2	5	4
VI-5b	7	6	1	4	2	6	3	4	3	2	6	4
VII-3a	6	1	1	9	3	6	6	0	2	0	5	5
VII-3b	7	2	2	3	4	3	2	0	2	0	5	5
VIIIa	7	5	2	4	6	1	6	5	2	3	3	4
VIIIb	7	2	2	4	6	11	3	4	3	1	3	7
IXa	4	2	2	4	4	8	6	7	3	2	5	3
IXb	7	5	2	1	6	10	5	4	3	3	3	5
XI-11a	0	2	2	4	6	7	3	8	1	0	0	4
XI-11b	7	2	2	6	1	8	5	0	3	0	0	5

Fig. 5 Haplotypes for the affected individuals of the LGMD2L cohort at the 11p13–p12 locus. The common haplotype, coloured in light grey, is shared by 62.5% of the carrier chromosomes. Two other chromosomes (12.5%) share a second haplotype, highlighted in dark grey. Haplotypes shown for families VIII and IX apply to all affected members of these families.

impact on the p75 neurotrophin receptor and its associated factors: an imbalance in the RIP2 switch could have explained the minor neurogenic component observed on the EMGs. For these reasons, we chose to sequence this gene. All six exons and exon/intron boundaries were sequenced, as well as the two putative exons contained in the 5' untranslated region. No mutations were detected, but known SNPs were observed. LOC119710 was also sequenced. Little is known about this predicted gene and the protein it encodes. However, GeneNote expression arrays suggest a high expression of the mRNA in both skeletal and cardiac muscles (Yanai *et al.*, 2005). No mutations were detected in the five coding exons and the exon/intron boundaries. At this point, we cannot exclude putative mutations in the regulatory elements or promoters of these two genes, large deletions or post-translational modifications.

Discussion

This study is the first to report a new chromosomal locus linked to a form of variable limb-girdle muscular dystrophy associated with marked, asymmetrical atrophy of the biceps brachii and quadriceps femoris and myalgia. The disease phenotype demonstrates important variability among and between families. CK levels remain largely uninformative, as 28.6% of our cohort exhibited CK values within the normal range (Table 2). Some of the EMG findings, particularly in the more severe cases, raise the possibility of a neurogenic component to the disease. The combination of myopathic and neurogenic findings was also previously described in cases of 'quadriceps myopathy' (Boddie and Stewart-Wynne,

1974). MRI is clearly a very sensitive means to confirm muscle involvement in the milder cases, and it confirms the clinical observations of asymmetrical atrophy and weakness. Inflammatory changes are not a feature of this disease and may only correlate with severity. Case VIII-6, which demonstrates some inflammatory change on biopsy, is clinically and pathologically one of the most affected of our cohort. This LGMD links to a less than 3.3 cM (1.4 Mb) region on 11p13–p12.

We propose to name this new disease LGMD2L, in keeping with the current nomenclature (Bushby and Beckmann, 1995). Its extreme variability of involvement among and between families may have limited its clear identification in the past. The age of onset is one such variable: two patients presented with symptoms before the age of 20, two between 21 and 30, six between 31 and 40, three between 41 and 50, and one remains asymptomatic in her late sixties despite abnormal clinical and MRI evaluations (Fig. 2B and G) and elevated CK values for more than two decades (case IX-9, Table 2). Intrafamilial variability is demonstrated in both families VIII and IX. Patient VIII-6 displays a more severe atrophy than his affected sisters, VIII-3 and VIII-4: symptoms began at an earlier age and his CKs are notably higher than his sisters', whose CK values were found to be normal (Table 2). In family IX, this range in severity of affection is even more pronounced. Patient IX-13 was wheelchair bound by the age of 34, while his brothers IX-10 and IX-11 are still able to walk into their late sixties. Their sister, IX-9, the elder of the affected siblings, is still asymptomatic, displays elevated CK levels, and has a very mild muscular atrophy. This variability also extends to single individuals, as a clear asymmetry of

the muscular wasting was noted. Interfamilial and intra-familial variability in phenotype, as well as an asymmetrical muscular atrophy, seem to be a hallmark of this form of LGMD. By combining clinical and MRI findings, we suggest that the following muscles are the first affected in this LGMD: the long head of the biceps brachii, the hamstring muscles (in particular the semimembranosus) and the adductor magnus. As the disease progresses, atrophy and weakness extend to the vastus medialis and the tensor fasciae latae. The early involvement of the hamstring muscles and adductor magnus in our cohort seems to be also found in a number of AR-LGMDs, most notably LGMD2A and LGMD2I for which MRI studies revealed a severe atrophy of these muscles (Fischer *et al.*, 2005). However, these LGMD2A and LGMD2I cases showed a symmetrical atrophy, while our patients demonstrate a clear asymmetry in muscle wasting. We believe this asymmetry could help in the clinical diagnosis until the mutated gene is uncovered. As shown in Table 1, all previously described recessive LGMD have distinctive features from LGMD2L except LGMD2B. Though it is possible that the important variability has limited the diagnosis of cases affected with LGMD2L in the past, it is likely that some of the cases of 'quadriceps myopathy', which were indeed later shown to have progressed into a limb-girdle type of muscular dystrophy, were affected by this disease (Boddie and Stewart-Wynne, 1974; Walton, 1956).

No tubular filamentous inclusions or important signs of inflammation were reported in our participants (with the exception of one demonstrating focal inflammation), thereby excluding the diagnosis of IBM. Clinically, LGMD2L patients did not demonstrate finger flexor weakness or atrophy. While the hallmark of the hereditary form of IBM is a characteristic sparing of the quadriceps muscle, quadriceps myopathies have frequently been associated with the sporadic form of IBM. Inclusion body myositis is further characterized by diminished deep tendon reflexes, dysphagia and atrophy of the proximal limb muscles (Burstein *et al.*, 2005). The absence of inflammation in muscle biopsies seems to rule out the possibility of a new form of hereditary IBM. To further exclude this possibility, the GNE gene was sequenced and found to carry no mutation. An in-depth pathological review of the first and only muscle biopsy we had access to, patient IX-15's biopsy, uncovered a disorganization of the basal lamina and extracellular matrix which may suggest that the mutated protein in LGMD2L is either an extracellular matrix or basal lamina protein or a protein important in ensuring the dynamic relationship between the muscle fibre and the extracellular matrix. Further pathological work should allow a better understanding of the pathophysiology of the disease.

Haplotype analysis helped refine the candidate region to a small interval and demonstrated that up to 81.3% of carrier chromosomes may share parts of an ancestral haplotype (Fig. 5). Ten of the sixteen carrier chromosomes (62.5%)

seem to share the common haplotype on three consecutive markers or more, while two (12.5%) share a second haplotype. Surprisingly, the affected cases of the consanguineous family IX, though they share the same two haplotypes for the region, are homozygous only for one allele of the haplotype shared by many families (Fig. 5). We conclude that the two mutations present in these affected cases were not transmitted through the known consanguineous loop and were likely introduced independently in the family through a more distant relationship. Supposing that the presumed historical recombinations between D11S935 and D11S4185 telomerically, and between D11S4185 and D11S4102 centromerically, have reshaped chromosome IXb, this would make, respectively, D11S935 and D11S4102 the telomeric and centromeric flanking markers for a candidate interval of 1.4 cM (725 kb). It is interesting to note that, despite the relatively young ancestry of the French-Canadian population (~400 years), homozygosity at the locus is rare and the conserved region is surprisingly small. This observation can, however, be explained in two ways. First, most of the cases in our cohort have a family history traceable to the Southwest of the Province of Quebec, a region which, unlike the better studied region of Saguenay-Lac-Saint-Jean (Scriber, 2001), displays more genetic heterogeneity and less of a more proximal consanguinity. Second, if the more major mutation is older than the French colonization that began in 1608 and was introduced more than once in Quebec, this could also explain the relatively small shared ancestral haplotype.

No other LGMD families or, in fact, other neuromuscular hereditary diseases have been linked to this region of chromosome 11p13–p12. Eight genes appear to lie in the candidate region: LOC143458, FLJ45212, COMMD9, FLJ14213, TRAF6, RAG1, RAG2 and LOC119710. COMMD9 has homologues in the mouse and the rat, among other animals, and its protein, COMM domain containing protein 9, has 198 amino acids. The GeneNote expression array data indicates the protein is highly expressed in skeletal muscles (<http://bioinfo.weizmann.ac.il>). A recent paper has shown that COMM-domain-containing proteins are regulators of NF κ B; thus, potentially linking them to apoptosis and cachexia (Burstein *et al.*, 2005). The RAG1 and RAG2 protein products are initiators of the V(D)J recombination pathway in immunoglobulins (Oettinger, 1992). Mutations in both RAG genes have been linked to either of the two forms of severe combined immunodeficiency syndromes (Tabori *et al.*, 2004). Four predicted proteins of unknown function are also encoded in this interval: LOC143458, FLJ45212, FLJ14213 and LOC119710. The centromeric half of the interval (734 606 bp) contains no known gene. No genes have been predicted to lie within this region by most bioinformatic programs, with the exception of GenScan, the biostatistical algorithms of which predict four more genes on the centromeric side of LOC119710 in our interval (Burge and Karlin, 1997). While no mutations were found in the coding sequences of TRAF6

and LOC119710, further work will be required to exclude potential mutations in their regulatory and promoter regions.

The identification of the mutated gene responsible for this new recessive LGMD will require the sequencing of other genes in the candidate interval and the recruitment of other LGMD2L cases of different ethnic backgrounds. The variability of the phenotype and the asymmetry of the atrophy are reminiscent of some of the features of facio-scapulohumeral muscular dystrophy type 1A (FSHMD1A, OMIM 158900). This raises the possibility that as in FSHMD1A a non-coding repeat mutation is responsible for LGMD2L (van der Maarel and Frants, 2005). In FSHMD1A the repeat is variably contracted in affected individuals, leading to an overexpression of genes upstream of the repeats. Although no LSau or hhsp3 repeats, known components of the FSHMD1A D4Z4 repeats, were found in the LGMD2L candidate interval, a similar type of mutation might explain the variability of the phenotype and asymmetry of muscle wasting. The identification of the mutations responsible for LGMD2L should provide further insight into the complex pathways leading to adult onset muscular dystrophies.

Acknowledgements

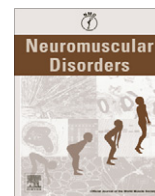
We would like to thank Marie-Pierre Dubé for her help in linkage analysis and Dr Louise F. Charron for referring to us the family of LGMD2L. This work was supported by an MDA grant (MDA 4001). B.B. is a chercheur-boursier of the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ).

References

- Bharti AC, Takada Y, Shishodia S, Aggarwal BB. Evidence that receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand can suppress cell proliferation and induce apoptosis through activation of a NF-kappaB-independent and TRAF6-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 6065–76.
- Boddie HG, Stewart-Wynne EG. Quadriceps myopathy—entity or syndrome? *Arch Neurol* 1974; 31: 60–2.
- Bramwell E. Observations on myopathy: symmetrical atrophic paresis of the quadriceps muscles of probable myopathic origin. *Proc R Soc Med* 1922; 16: 1–3.
- Burge C, Karlin S. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* 1997; 268: 78–94.
- Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, et al. COMMD proteins: a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* 2005; 280: 22222–32.
- Bushby KM. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 1999; 122: 1403–20.
- Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies—proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 337–43.
- Charniot JC, Pascal C, Bouchier C, Sebillon P, Salama J, Duboscq-Bidot L, et al. Functional consequences of an LMNA mutation associated with a new cardiac and non-cardiac phenotype. *Hum Mutat* 2003; 21: 473–81.
- Darin N, Kyllerman M, Wahlstrom J, Martinsson T, Oldfors A. Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia and rimmed vacuoles. *Ann Neurol* 1998; 44: 242–8.
- Denny-Brown D. Myopathic weakness of the quadriceps. *Proc R Soc Med* 1939; 32: 867–9.
- Eisenberg I, Hochner H, Shemesh M, Levi T, Potikha T, Sadeh M, et al. Physical and transcriptional map of the hereditary inclusion body myopathy locus on chromosome 9p12–p13. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 501–9.
- Espir ML, Matthews WB. Hereditary quadriceps myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1973; 36: 1041–5.
- Fischer D, Walter MC, Kesper K, Petersen JA, Aurino S, Nigro V, et al. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol* 2005; 252: 538–47.
- Frosk P, Weiler T, Nylen E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 663–72.
- Furukawa T, Akagami N, Maruyama S. Chronic neurogenic quadriceps amyotrophy. *Ann Neurol* 1977; 2: 528–30.
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 2001; 21: 5854–63.
- Kobayashi T, Walsh MC, Choi Y. The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes Infect* 2004; 6: 1333–8.
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1347–63.
- Kudryashova E, Kudryashov D, Kramerova I, Spencer MJ. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J Mol Biol* 2005; 354: 413–24.
- Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J* 2004; 18: 227–37.
- Lathrop GM, Lalouel JM. Easy calculations of LOD scores and genetic risks on small computers. *Am J Hum Genet* 1984; 36: 460–5.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3443–6.
- Lathrop GM, Lalouel JM, White RL. Construction of human linkage maps: likelihood calculations for multilocus linkage analysis. *Genet Epidemiol* 1986; 3: 39–52.
- Mümenthaler M. Myopathy in neuropathy. In: Walton JN, Canal N, Scarlato G, editors. *Muscle diseases*. Vol. 199. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation; 1970. p. 585–98.
- Oettinger MA. Activation of V(D)J recombination by RAG1 and RAG2. *Trends Genet* 1992; 8: 413–6.
- Phillips BA, Cala LA, Thickbroom GW, Melsom A, Zilko PJ, Mastaglia FL. Patterns of muscle involvement in inclusion body myositis: clinical and magnetic resonance imaging study. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1526–34.
- Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002; 67: 203–33.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000. p. 365–86.
- Schindl K, Rueker O. Differential interference contrast for transmitted-light (Nomarski method). *J Biol Photogr Assoc* 1973; 41: 109–11.
- Scriber CR. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 69–101.
- Serratrice GT, Munsat TL. Overview of the pathogenesis and therapy of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 1995; 68: 1–5.
- Shokeir MH, Kobrinsky NL. Autosomal recessive muscular dystrophy in Manitoba Hutterites. *Clin Genet* 1976; 9: 197–202.
- Shokeir MH, Rozdilsky B. Muscular dystrophy in Saskatchewan Hutterites. *Am J Med Genet* 1985; 22: 487–93.
- Sternberger LA. Some new developments in immunocytochemistry. *Mikroskopie* 1969; 25: 346–61.

- Sunohara N, Arahata K, Hoffman EP, Yamada H, Nishimiya J, Arikawa E, *et al.* Quadriceps myopathy: forme fruste of Becker muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1990; 28: 634–9.
- Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol* 2006; 59: 808–15.
- Tabori U, Mark Z, Amariglio N, Etzioni A, Golan H, Biloray B, *et al.* Detection of RAG mutations and prenatal diagnosis in families presenting with either T-B- severe combined immunodeficiency or Omenn's syndrome. *Clin Genet* 2004; 65: 322–6.
- Turner JW, Heathfield KW. Quadriceps myopathy occurring in middle age. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1961; 24: 18–21.
- van der Maarel SM, Frants RR. The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 375–86.
- Walton JN. Two cases of myopathy limited to the quadriceps. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1956: 106–8.
- Wicklund MP, Mendell JR. The limb girdle muscular dystrophies: our ever-expanding knowledge. *J Clin Neuromuscul Dis* 2003; 5: 12–28.
- Yanai I, Benjamin H, Shmoish M, Chalifa-Caspi V, Shklar M, Ophir R, *et al.* Genome-wide midrange transcription profiles reveal expression level relationships in human tissue specification. *Bioinformatics* 2005; 21: 650–9.
- Zatz M, de Paula F, Starling A, Vainzof M. The 10 autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 532–44.
- Zelinski T. The use of DNA restriction fragment length polymorphisms in conjunction with blood group serology. *Transfusion* 1991; 31: 762–70.

**Annexe III. Srour, Bolduc et al., *Neuromusc Dis*
(2010) 20 : 453-7**



DOK7 mutations presenting as a proximal myopathy in French Canadians

Myriam Srour^a, Véronique Bolduc^a, Velina Guergueltcheva^b, Hanns Lochmüller^c, Daniel Gendron^d, Michael I. Shevell^e, Chantal Poulin^e, Jean Mathieu^f, Jean-Pierre Bouchard^g, Bernard Brais^{a,*}

^a Laboratoire de neurogénétique de la motricité, Centre de recherche du CHUM, Montréal, Université de Montréal, QC, Canada

^b Molecular Myology Lab, Friedrich-Baur-Institut, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

^c Institute of Human Genetics, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK

^d Department of Neurology, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Quebec, Canada

^e Departments of Neurology/Neurosurgery and Pediatrics, McGill University, Division of Pediatric Neurology, Montreal Children's Hospital-McGill University Health Center, Quebec, Canada

^f Clinique des Maladies Neuromusculaires, Carrefour de Santé de Jonquière, Saguenay, Québec, QC, Canada

^g Département des sciences neurologiques, CHAUQ - Hôpital de l'Enfant-Jésus, Université Laval, Québec, QC, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2009

Received in revised form 25 March 2010

Accepted 14 May 2010

Keywords:

Congenital myasthenic syndrome

DOK7

Myopathy

Neuromuscular transmission

ABSTRACT

DOK7 mutations cause a congenital myasthenic syndrome (OMIM 254300) characterized by a “limb-girdle” phenotype. We identified 7 French-Canadian patients with a previously undiagnosed proximal myopathy. A genome wide scan was performed. Homozygosity mapping identified a locus on chromosome 4p16.2 containing DOK7. Sequencing of DOK7 revealed homozygous 1124_1127dupTGCC mutations in all individuals. SNP genotyping of 42 kb surrounding DOK7 in our cohort and in 9 patients of various European origins demonstrated a shared haplotype suggesting a common ancestral European mutation. In our cohort, fatigability was not prominent; rather patients reported prolonged periods of increased weakness. Abnormalities on repetitive nerve stimulation and single fiber EMG were not invariably present. There was considerable intra-familial phenotypic variability, and we report an asymptomatic individual. DOK7 mutations should be considered in patients with early-onset myopathy, even in the absence of symptoms suggesting a possible myasthenia.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are a heterogeneous group of disorders caused by mutations in genes expressed at the neuromuscular junction and result in compromised neuromuscular transmission. To date, 12 genes encoding proteins present in the presynaptic, synaptic and postsynaptic neuromuscular junction have been found to be mutated in CMS [1–5]. In 2006, Okada et al. functionally characterized Dok-7 (downstream of kinase-7) and showed that it could induce aneural activation of MuSK (muscle-specific receptor-tyrosine kinase) and subsequent clustering of acetylcholine receptors in cultured mouse myotubes [6]. In 2006, Beeson et al. identified DOK7 mutations in 21 patients with congenital myasthenic syndromes with a characteristic limb girdle weakness, and showed that these patients had small simplified neuromuscular junctions on histology with normal acetylcholine receptors and acetylcholinesterase function [7]. Further functional studies have shown that Dok-7 is essential in maintaining the size and structural integrity of the end plate [8].

We describe 7 French-Canadian patients who were initially diagnosed with childhood-onset proximal myopathy of unknown origin. Since all patients presented with a similar phenotype and originated from the Charlevoix-Saguenay-Lac Saint-Jean (CSLSJ) region in Quebec, a region well known for its high prevalence of recessive founder diseases, we performed a genome wide SNPs analysis [9]. Homozygosity mapping uncovered the 4p16.2 locus, known to contain the DOK7 gene. Sequencing DOK7 uncovered a common mutation. In this paper, we describe clinically our cohort of French-Canadian patients with DOK7 congenital myasthenic syndrome. In addition, in order to establish whether the French-Canadian mutation has a European origin, we genotyped using SNP markers, a 42 kb region surrounding DOK7 in our patients and in 9 patients of European ancestry (including an individual from Brazil) carrying the same mutation.

2. Patients and methods

2.1. Clinical evaluation

We recruited 7 individuals from 5 families with a childhood onset myopathy of unknown etiology. This project was approved by institutional Ethics Committee of the Center de Recherche du

* Corresponding author. Address: Laboratoire de neurogénétique de la motricité, Université de Montréal, CRCHUM, M4211-L3, 1560 Sherbrooke Est, Montreal, Quebec, Canada H2L 4M1. Tel.: +1 514 890 8000x 25560; fax: +1 514 412 7525.

E-mail address: bernard.brais@umontreal.ca (B. Brais).

CHUM. Informed consent was obtained from all patients, their parents if under 18, and all participating family members. All patients underwent a detailed interview and neurological examination. Medical charts were reviewed. After the identification of the *DOK7* mutation, the patients were re-examined and repetitive nerve conduction tests and single fiber EMG were performed when possible. DNA samples on non-Canadian cases were provided by Dr. Lochmüller.

2.2. DNA isolation

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using Gentra Puregene Blood kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) or by saliva using the Oragene DNA extraction kit (DNA Genotek, Ottawa, Canada).

2.3. Genotyping, homozygosity mapping, haplotype analysis and linkage analysis

We performed genome-wide scans by typing 317,503 SNPs using the HumanHap300 genotyping BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA) at the Genome Quebec Innovation Center (McGill University, Montreal, Canada) on individual D.I (Supplementary Fig. 1). Search for regions of homozygosity was performed using IBDfinder [10]. All recruited individuals were genotyped at the chromosome 4p16.2 locus using the following microsatellite markers: D4S2936, D4S3038, D4S1614, D4S3034, D4S412, D4S179, D4S2957, and D4S3023. Each forward primer was elongated with a M13 sequence at its 5' end and gDNA was amplified in presence of the two primers of each marker as well as a M13 oligo marked with a fluorescent label (Primer sequences listed in Supplementary Table 1). PCR products were sent to Genome Quebec Innovation Center Genotyping Platform and run on an ABI-3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Chromatograms were analyzed using GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

2.4. *DOK7* sequencing

The entire coding sequence, the 5' and 3' UTRs, as well as the exon–intron boundaries of *DOK7* were screened for mutations based on sequence NM_173660.3 (UCSC March 2006 Assembly Hg18). Primers were designed using Primer3 [11] or were taken from a previously published article [7]. Primer sequences used are detailed in Supplementary Table 1. The PCR products and primer pairs were sent to the Genome Quebec Innovation Center Sequencing Platform for forward and reverse sequencing. Sequences were aligned and analyzed using SeqMan 4.03 (DNASTar, WI, USA).

2.5. Determination of mutation ancestry

Tag SNPs covering a 42 kb interval surrounding *DOK7* were chosen using HapMap (<http://www.hapmap.org/>) with a heterozygosity score above 0.13 for the CEU population (Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection). The following SNPs were used, and frequency estimates of the minor allele are given in parentheses: rs1203104 (0.342), rs10022329 (0.143), rs6831256 (0.385), rs13128489 (0.134), rs12644455 (0.236), rs10022432 (0.36), rs1054661 (0.36), rs13130443 (0.183), rs2858023 (0.451) and rs3468 (0.305). Genotypes were determined by genomic sequencing of the region surrounding the SNP in 6 French-Canadian patients from our original cohort, 8 patients of European origin and an additional French-Canadian patient all bearing at least one copy of the 1124_1127dupTGCC mutation. Sequences of the primers used are

listed in Supplementary Table 1. Haplotypes were phased by genotyping one parent for each patient.

3. Results

3.1. Determination of the causative locus and identification of *DOK7* mutation

Pedigrees of the 7 French-Canadian individuals are presented in Supplementary Fig. 1A. None of the parents are affected with a similar condition. Segregation is consistent with an autosomal recessive transmission. All families originate from the Charlevoix and Saguenay-Lac-Saint Jean regions of Quebec (Supplementary Fig. 1B). Homozygosity mapping in individual D.I revealed 9 homozygous regions greater than 1 Mb in length, including a 3.65 Mb region on chromosome 4p16.2 containing the *DOK7* gene, which has been found to be mutated in a congenital myasthenic syndrome [7]. Genotyping of all the individuals using microsatellite markers confirmed a shared homozygous haplotype surrounding *DOK7*. Given the similarity in the phenotype amongst our patients and those described with mutations in *DOK7*, namely a limb-girdle distribution of weakness, we sequenced *DOK7* in all our patients and found a homozygote 1124_1127dupTGCC mutation in all patients.

3.2. Clinical description of cases

A summary of the clinical features of the patients is presented in Table 1. The majority of patients presented in early childhood (mean: 7 years, age range: 1–20 years) with proximal lower limb weakness and gait difficulties. Of note, individual B.I is still asymptomatic at age 50 and was only identified because of her two symptomatic siblings. All patients had normal motor milestones. Two patients had ptosis and no one had ophthalmoparesis or bulbar symptoms. Fatigability was not a prominent feature on history and patients did not report clear daily fluctuations of weakness or ptosis. However, most patients (5/7) reported prolonged periods of increased weakness lasting weeks to months, usually in late childhood and early adolescence. Two patients (individuals C.I and D.I) lost the ability to walk long distances and required the use of a wheelchair for several years during adolescence, then recovered functional gait in their late teens. Patient B.II sought medical attention at the age of 26 years for right arm weakness following the birth of her child. No one currently uses any ambulatory aids. Only one patient has respiratory symptoms with restrictive lung disease. Two patients have scoliosis, but none required any corrective surgery. Approximately one half (4/7) of patients have distal hyperlax joints. All patients, except for the asymptomatic individual B.I, have fatigable weakness on examination of deltoids as well as mild (4/5) proximal weakness in the upper and lower limbs. Most also had minimal weakness distally. Four individuals had a waddling gait. Serum creatine kinase levels were not significantly increased in any of the patients. Muscle biopsies were performed on 5 patients: 2 showed normal histology, and 3 revealed evidence of non-specific changes such as fiber size variation, some areas of increased fibrosis and type 1 fiber predominance (data not shown). No electron microscopy was performed to look at the end-plate structure.

Following the identification of the mutations in the *DOK7* gene, we performed repetitive nerve stimulation testing at 3 Hz in all patients, and single fiber examinations in 3 patients. On repetitive nerve stimulation examination, 5/7 patients had a clear decremental response pattern, and 2/7 had normal responses. Amongst the patients with the normal repetitive nerve stimulation, individual A.I was symptomatic and individual B.I was completely asymptomatic. Single fiber EMG on trapezius and vastus lateralis muscles in

Table 1Clinical characteristics of French-Canadian patients with *DOK7* congenital myasthenia (APB: Abductor pollicis brevis; NA: Not available; y: year).

Individual	A.I	B.I	B.II	B.III	C.I	D.I	E.I
Mutation	homo. dupTGCC	homo. dupTGCC	homo. dupTGCC	homo. dupTGCC	homo. dupTGCC	homo. dupTGCC	homo. dupTGCC
Age (y)	27	49	46	43	24	25	52
Gender	F	F	F	M	F	F	F
Age at onset (y)	“childhood”	asymptomatic	“childhood”	20s	1st year	7	<9
Symptom at onset	gait difficulties	none	weakness	gait difficulties	gait difficulties	gait difficulties	ptosis
Motor delay	no	no	no	no	no	no	no
Ptosis	no	no	no	yes	no	no	yes
Ophthalmoparesis	no	no	no	no	no	no	no
Facial weakness	no	no	no	no	no	no	no
Bulbar symptoms	no	no	no	no	no	no	no
Walking aids	none	none	none	none	none	none	none
Intermittent worsening	yes	no	yes	yes	yes	yes	no
Respiratory	no	no	no	no	no	yes-mild	no
Proximal weakness	yes	no	yes	yes	yes	yes	yes
Scoliosis	no	no	no	no	yes	yes	no
Hyperlaxity	yes	no	NA	yes	yes	yes	no
Fatiguability on exam	yes	no	yes	yes	yes	yes	yes
CK	normal	normal	normal	mild ↑	normal	NA	normal
Decremental pattern	no	no	yes	yes	yes	yes	yes
	APB	Trapezius	Trapezius	APB	APB	Biceps brachii and Trapezius	Trapezius
Single fiber EMG	NA	normal	NA	NA	NA	abnormal	abnormal

individual B.I did not show increased jitter. Single fiber EMG was not performed in individual A.I.

Two patients received medical treatment. One patient (A.I) is on salbutamol 4 mg TID, and reports improved energy level and decreased fatigue, however segmental strength testing 90 min after taking medication did not show clear improvement. Patient E.I. was treated with ephedrine and + 3,4-DAP, then ephedrine was replaced with salbutamol after it became poorly tolerated at higher doses. Salbutamol was well tolerated by both. Case E.I had systematic and standardized testing at 1, 3, 6 and 12 months using the following tests: 2 min walk test, four square step test, chair stand test, timed up and go test, 10 meter walk test, timed up and down 4 steps and Berg Balance scale. Drastic and sustained functional improvement was documented, with scores improving by 23 to 82% (see Table 2).

3.3. Ancestral origin of the common mutation

Haplotyping of 11 SNPs located in a 42 kb region surrounding *DOK7* in the French-Canadian patients and in the 8 non-French-Canadian patients demonstrated a shared haplotype among all individuals carrying the common 1124_1127dupTGCC mutation. This is illustrated in Table 3. This region consists of 6 haploblocks in the CEU population according to HapMap (www.hapmap.org).

Their haplotype sharing strongly supports that the French-Canadian common mutation is the same as the one found in the non-French-Canadian patients of European descent.

4. Discussion

We identified mutations in *DOK7* in a cohort of seven French-Canadian patients previously diagnosed with a myopathy of unknown origin. Mutations in *DOK7* cause a congenital myasthenic syndrome with a so-called “limb-girdle phenotype”. Despite their greater genetic homogeneity, the clinical phenotype of our cohort is similar to that previously described: patients have a childhood onset of symptoms after normal motor milestones, limb-girdle distribution of weakness, variable ptosis and a typical waddling gait. In addition, patients did not have prominent daytime-fatigable weakness, but rather experienced prolonged periods of exacerbations lasting weeks or months as described in other cases [2,12]. This study also documents that some homozygotes can be asymptomatic. Significantly, two individuals lost their ability to walk and became wheelchair dependent in their late childhood, then recovered their gait after several years, suggesting a prolonged period of partially reversible weakness. It is of note that this unusual phenomenon had an important psychological impact on 2 patients, who were often accused of malingering by their peers. A similar

Table 2Response to medication of patient E.I with *DOK7* congenital myasthenia.

	Baseline	Ephedrin 16 mg t.i.d. +1 month	Ephedrin 16 mg tid + 3,4-DAP 10 mg tid +3 months	Salbutamol 4 mg tid + 3,4-DAP 20 mg tid +6 months	Salbutamol 6 mg tid + 3,4-DAP 20 mg tid +12 months
2 min Walk test (ft)	302	393	−30%	385	−27%
Four square step test (sec)	65.81	21.03	−68%	18.9	−73%
Chair stand test	×8 + ×1 with 2 hands	×8 + ×4 with 2 hands		×10 + ×1 with 2 hands	×10 + ×2 with 2 hands
Timed Up and Go test (sec)	14.84	11.25	−24%	10.68	−28%
10 m Walk test (sec)	11.25	8.75	−22%	8.68	−23%
Time up 4 steps (sec)	7.62	3.56	−53%	3.28	−57%
Time down 4 steps (sec)	9.25	2.84	−69%	3.09	−67%
Berg Balance Scale	42/56	51/56	−21%	51/56	−21%

Table 3

Results of SNP genotyping in patients carrying the common 1124_1127dupTGCC. Italics indicate inferred phases. NA = not available.

		DOK7										
		1124_1127										
SNP rsID		rs1203104	rs10022329	rs6831256	rs13128489	rs12644455	dupTGCC	rs10022432	rs1054661	rs13130443	rs2858023	rs3468
Position		3432800	3436867	3442487	3442950	3449774	3464635	3464994	3465739	3467972	3473910	3474796
Minor allele frequency		0.342	0.143	0.385	0.134	0.236		0.36	0.36	0.183	0.451	0.305
Minor allele		A	T	G	C	T		T	T	A	T	A
A.I	French-Canadian	NA	G	G	G	C	dupl	NA	C	NA	NA	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	NA	G	G	G	C	dupl	NA	C	NA	NA	A
B.III	French-Canadian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
C.I	French-Canadian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
D.I	French-Canadian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
E.I	French-Canadian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
1	Spanish	G	G	NA	G	C	dupl	T	C	NA	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	NA	G	C	dupl	T	C	NA	T	A
2	German	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
3	German	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/1124_1127dupTGCC	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
4	Braslian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	NA	A
	1124_1127dupTGCC/S45L	A	G	A	G	C	-	T	C	G	NA	G
5	Croatian/Serbian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/H132Q	G	G	A	G	C	-	C	T	G	C	G
6	Spanish	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/A33V	A	T	G	G	T	-	T	C	G	T	G
7	Spanish	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC/IVS2-1G>T	A	T	G	C	C	-	C	T	A	C	A
8	French-Canadian	G	G	G	G	C	dupl	T	C	G	T	A
	1124_1127dupTGCC and 1263insC	A	G	A	G	C	-	T	T	G	C	G
9	Portugese	G	G	G	G	C	dupl	NA	C	G	NA	A
	1124_1127dupTGCC/G64R	G	G	G	G	T	-	NA	T	G	NA	G

prolonged period of reversible weakness was observed in another individual who developed unilateral arm weakness after the birth of her child, presumably from prolonged carrying of her infant. Repeated electrophysiologic testing, though abnormal in most individuals, did not always provide evidence of abnormal neuromuscular transmission. Repetitive nerve stimulation at 3 Hz was normal in 2 individuals, and single fiber testing was normal in one. This emphasizes the requirement of a high index of suspicion for the diagnosis of DOK7 congenital myasthenia, despite lacking confirmatory concurrent electrophysiologic evidence. Two patients were treated with salbutamol either alone or in combination with other medications (such as ephedrin and + 3,4-DAP) and had clear subjective and objective improvement particularly in exercise tolerance and endurance.

Overall, our more genetically homogenous cases have a milder phenotype compared to what is usually reported in the literature [1,2,7,8,13,14], demonstrated by the fact that no one currently uses an aid for ambulation, has bulbar symptoms, facial weakness, significant respiratory difficulties, or a clear progressive condition. There may be several reasons for the milder phenotype. First, our recruitment method itself was likely to confer a bias towards a milder phenotype since we identified the patients based on a similar myopathy presentation (thus severe neonatal onset with respiratory dysfunction were not recruited). Secondly, most of our patients are homozygous for the common 1124_1127dupTGCC mutation, suggesting that homozygosity for the common mutation appears to lead to a milder phenotype. This mutation causes a frame shift resulting in truncation of the C-terminal region of the protein, which is suspected of playing a key role in the maturation of the synaptic structure [7]. In Müller et al., all patients with late-onset symptoms were homozygous for the 1124_1127dupTGCC mutation [2]. However, upon assessment of the remainder of the reported patients who are homozygous for this mutation [14], it is difficult to decipher a clear genotype-phenotype correlation. Several studies provide evidence of significant inter-familial phenotypic variability in DOK7 myasthenia [8]. Our study highlights the additional intra-familial phenotypic variability in DOK7 con-

genital myasthenia. In a family with 3 siblings bearing a homozygous mutation, one individual is symptomatic with proximal weakness and ptosis, the second had transient symptoms, and the third is asymptomatic with a normal neurological exam and neurophysiologic testing including single fiber EMG. To our knowledge, this is the first report of a completely asymptomatic individual carrying two DOK7 mutations. It is very important to bear this variability in mind, especially when providing genetic counseling to family members. Furthermore, it suggests that other genetic factors contribute to the severity of the phenotype in these familial cases that are independent of other variants in the 42 kb surrounding DOK7.

This study demonstrates that the French-Canadian patients and patients of various European descent carrying the common 1124_1127dupTGCC mutation all share the same haplotype. This surprising finding suggests that the mutation is very ancient, and appears to have arisen only once in European history.

This study underlines the importance of considering DOK7 mutations in the differential diagnosis of childhood onset myopathy even in absence of symptoms suggesting a possible myasthenia. Variability of weakness over weeks and months, a decremental response to repetitive nerve stimulation and increased jitter on single fiber EMG provide important clinical and laboratory clues, but their absence does not eliminate the diagnosis. Medical treatment leads to subjective and objective improvements in exercise tolerance and endurance. This study again demonstrates the importance of studying homogenous cohorts from population with founder effects to establish the degree of inter and intra-familial phenotypic variability [15].

Acknowledgments

We would like to thank the families who participated in this study, as well as the physicians who referred their patients to HL. VG is a research fellow of the Alexander von Humboldt Foundation. MS receives a fellowship of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.nmd.2010.05.007](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.05.007).

References

- [1] Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM. Further observations in congenital myasthenic syndromes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1132:104–13.
- [2] Müller JS, Herczegfalvi A, Vilchez JJ, et al. Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* 2007;130:1497–506.
- [3] Müller JS, Mihaylova V, Abicht A, Lochmüller H. Congenital myasthenic syndromes: spotlight on genetic defects of neuromuscular transmission. *Expert Rev. Mol. Med.* 2007;9:1–20.
- [4] Huze C, Bauche S, Richard P, et al. Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;85:155–67.
- [5] Maselli RA, Ng JJ, Anderson JA, et al. Mutations in LAMB2 causing a severe form of synaptic congenital myasthenic syndrome. *J. Med. Genet.* 2009;46:203–8.
- [6] Okada K, Inoue A, Okada M, et al. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 2006;312:1802–5.
- [7] Beeson D, Higuchi O, Palace J, et al. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* 2006;313:1975–8.
- [8] Selcen D, Milone M, Shen XM, et al. Dok-7 myasthenia: phenotypic and molecular genetic studies in 16 patients. *Ann. Neurol.* 2008;64:71–87.
- [9] Laberge AM, Michaud J, Richter A, et al. Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin. Genet.* 2005;68:287–301.
- [10] Carr IM, Sheridan E, Hayward BE, Markham AF, Bonthron DT. IBDfinder and SNPsetter: tools for pedigree-independent identification of autozygous regions in individuals with recessive inherited disease. *Hum. Mutat.* 2009;30:960–7.
- [11] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:365–86.
- [12] Slater CR, Fawcett PR, Walls TJ, et al. Pre- and post-synaptic abnormalities associated with impaired neuromuscular transmission in a group of patients with 'limb-girdle myasthenia'. *Brain* 2006;129:2061–76.
- [13] Anderson JA, Ng JJ, Bowe C, et al. Variable phenotypes associated with mutations in DOK7. *Muscle Nerve* 2008;37:448–56.
- [14] Palace J, Lashley D, Newsom-Davis J, et al. Clinical features of the DOK7 neuromuscular junction synaptopathy. *Brain* 2007;130:1507–15.
- [15] Gosselin I, Thiffault I, Tetreault M, et al. Founder SH3TC2 mutations are responsible for a CMT4C French-Canadians cluster. *Neuromuscul. Disord.* 2008;18:483–92.

Annexe IV. Tableau des amorces utilisées

Cartographie fine au locus 11p14.3-p15.1				
	Amorce m13-f	Amorce -r		Taille (pb)
D11S4106	CACGACGTTGTAAAACGACAATTCGGGACACAATCTACC	CTGAGTTCTCTGAGCCATTCTA		279-287
D11S1755	CACGACGTTGTAAAACGACAAGAGCCAGAGTGAAAT	TCTTTGCATGTACCCCAT		258-278
D11S4190	CACGACGTTGTAAAACGACGATAATGTTTGTGGTTGC	ACTCTCTATGGAACCCCC		209-229
D11S989	CACGACGTTGTAAAACGACACAACCTGTGTTTCGTCAATG	CTGTGATGTCCAAAATTACAGG		158-168
D11S1359	CACGACGTTGTAAAACGACGCTTCAAGTCTCGTATATCTGG	GCCTGCTGGCTTACCC		225-248
D11S915	CACGACGTTGTAAAACGACTGGTGTAACAATTAGCAGTG	CTAGGACAAAGCAAACTTC		273-293
Séquençage génomique de la portion codante d'ANOS				
	Amorce -f	Amorce -r		Taille (pb)
TMEM16E_2exon1	AGAGGGCAGGAGTGGAAG	AACCTCCCTAGGACTCAGGC		580
TMEM16E_2exon2	TTTCCTTACACAGACTTTTGAATATG	CAAAGGCTAGTTAACCTTATCTTG		199
TMEM16E_2exon3	GAAACTTAAAGACACCTTTTGC	TGGAAGAGAGTATCATCTTGCAG		208
TMEM16E_2exon4	CCAAGGGTAGTTTGTCTTTGTC	GGAATTAGTGACAATGTTCCCC		243
TMEM16E_2exon5	ATTCTTTTGTGCTTTTGCC	AATTCAATCCAGATATCCATGTG		263
TMEM16E_2exon6	ATCCAGAGTCACAGCCATTG	GGCAAAGGCCAGAGTAGGAG		236
TMEM16E_3exon7	TGTTTCTCAAAGTTTTCCTG	CACCTTGCAGAAATGGTACG		536
TMEM16E_2exon8	AAATTGTGATTGAAAGAAATGTGG	GAAGATTCTCTCTCCAGTAATGAAC		265
TMEM16E_2exon9	TTTACTAACATCTTAGAACAGCAGTG	GTGTAGATATGAAATCAAGAAGTTGTG		337
TMEM16E_2exon10	(TMEM16E_2exon10-12-f) tctgaatacaaaatcaaggctcC	TMEM16E_intron10	accaggtagaggcaactgt	375
TMEM16E_exons11-12	acctaacacacatcactgttcaat	TMEM16E_2exon10-12	TCATCTGTCATATGTTATATGGAGG	398
TMEM16E_2exon13	GCCACCTGAAACATGTGAAC	CGTTGCAGAATATTTTAAAGGC		368
TMEM16E_2exon14	TGTGATATTGACTAGTGCTTGGAG	GAGACATTGTAGGTAACACTGTTGAG		236
TMEM16E_exon15	GAGACTGACTTAGTTTGCTTTGC	GAACTCCTGGAGACCTGATCC		450
TMEM16E_2exon16	TTCACTTGTCTAGGGAGTACG	TGAATCAGTGCTTGACACACAG		328
TMEM16E_exon17	TTAACCTTCCAACCAAAACC	AACAAAGGCCACCATGGTAATC		316
TMEM16E_2exon18	TTCTGCCAGTTTCCAGATCTAAC	ggcaGAAAGAAGTATCTGGAGC		299
TMEM16E_3exon19	GGAAGTAGCAGGATTTGGGC	AGCATCATTCACATCTCCCC		359
TMEM16E_2exon20	TTGTGTTTCAGGACAAAGACTTG	TGCCCTAAGAAAATCCTTTATATTG		446
TMEM16E_3exon21	aagtTCCTCTGTGATTTCTTCTTAG	TTGTACTAAGAATATCCCTAAGGTGC		502
TMEM16E_2exon22	TGAATGATTGTAAAGACTTTCTGC	CAACATCACAAGTTGGCCTC		475
Amplification d'ANOS à partir de l'ADNc et séquençage des clones ANOS				
	Amorce -f	Amorce -r		Taille (pb)
TMEM16E_RT_A2	GCCTGCAGAAGGAAGAGC	TMEM16E_RT_B3	TCATTTGGAAGAGTAGTCTATATGC	237
TMEM16E_RT_A4	GGATCTCCTGGAAGTGTGG	TMEM16E_RT_O2	GCCTAATCCCATCTCGGAAG	223
TMEM16E_RT_C	GCAGCAGAGAGACCAGCTTT	TMEM16E_RT_U	TCAAGACCTGTTTTCTGAGATT	243
TMEM16E_RT_O	CTTCGAGATGGGATTAGGC	TMEM16E_RT_N3	TGCCAAAAGGACATCTTGAG	463
TMEM16E_RT_P	TGTGAAGTATCCCCATCCTGA	TMEM16E_RT_N3	TGCCAAAAGGACATCTTGAG	138
TMEM16E_RT_P	TGTGAAGTATCCCCATCCTGA	TMEM16E_RT_N2	GCCCAATTCTGGTGAAGTGT	299
TMEM16E_RT_E	GGCAACCTCTTCTCCATCT	TMEM16E_RT_N	ACCACCAATCTCAGGGTCAC	429
TMEM16E_RT_M	ATTCTTGCAGCTGTAGTTGG	TMEM16E_RT_V	AGCTGCTGCTGTTCTCTTC	330
TMEM16E_RT_W	TTCTCCCATTTGTTTGATAATGA	TMEM16E_RT_F	GACTGACAGCGGTACACAA	342
TMEM16E_RT_G	TTTCAGGAGCCACAGTGACA	TMEM16E_RT_S2	CGTAGAAGCAGGATGAGTAAAAA	341
TMEM16E_RT_F2	TTGTGTACCGCTGTCAGTC	TMEM16E_RT_R	AAAAATCTGTTTCCCGGTCA	430
TMEM16E_RT_S	TTTTTACTCATCTGCTTCTACG	TMEM16E_RT_H	CAAAGGAAAAGAGGCCACAA	359
TMEM16E_RT_I	GACCCCTTGGGCTTTTCTAT	TMEM16E_RT_J	GGACATGCCAGAATTGCATA	491
TMEM16E_RT_K	ATGCCACACAGCCTATGACA	TMEM16E_RT_L2	AGATCACCTGCTGCTTCTC	468
TMEM16E_RT_T	CGCCCTAAGCACACTCTAT			
Amorces contrôles pour RT-PCR				
	Amorce -f	Amorce -r		Taille (pb)
G3PDH_RT	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCTGTTGCTGTA		450

